

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7700101号

(P7700101)

(45)発行日 令和7年6月30日(2025.6.30)

(24)登録日 令和7年6月20日(2025.6.20)

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 9/51 (2006.01)

A 6 1 K 9/51

Z N A

A 6 1 K 47/22 (2006.01)

A 6 1 K 47/22

A 6 1 K 47/28 (2006.01)

A 6 1 K 47/28

A 6 1 K 47/10 (2017.01)

A 6 1 K 47/10

A 6 1 K 47/26 (2006.01)

A 6 1 K 47/26

請求項の数 25 (全138頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-514708(P2022-514708)

(86)(22)出願日 令和2年9月3日(2020.9.3)

(65)公表番号 特表2022-546597(P2022-546597
A)

(43)公表日 令和4年11月4日(2022.11.4)

(86)国際出願番号 PCT/US2020/049266

(87)国際公開番号 WO2021/046265

(87)国際公開日 令和3年3月11日(2021.3.11)

審査請求日 令和5年9月1日(2023.9.1)

(31)優先権主張番号 62/940,104

(32)優先日 令和1年11月25日(2019.11.25)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/910,720

(32)優先日 令和1年10月4日(2019.10.4)

最終頁に続く

(73)特許権者 520068043

ジェネレーション バイオ カンパニー
アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 0
2 1 4 2 ケンブリッジ ビネイ ストリ
ート 3 0 1 スイート 4 0 1

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

最終頁に続く

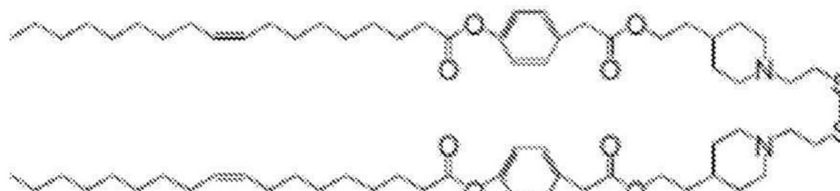
(54)【発明の名称】 閉端DNAおよび切断可能脂質を含む脂質ナノ粒子組成物ならびにそれらの使用方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

脂質ナノ粒子(LNP)を含む薬学的組成物であって、前記LNPが、SS切断可能脂質、ステロール、および閉端DNA(c e DNA)を含み、前記SS切断可能脂質が、式I:

【化12】



10

のss-OP脂質を含む、薬学的組成物。

【請求項2】

前記ステロールが、コレステロール、またはβ-シトステロールである、請求項1に記載の薬学的組成物。

【請求項3】

前記LNPが、ポリエチレングリコール(PEG)、またはPEG-脂質コンジュゲートをさらに含む、請求項1~2のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

20

【請求項 4】

前記 PEG または PEG-脂質コンジュゲートが、1-(モノメトキシ-ポリエチレングリコール)-2,3-ジミリストイルグリセロール (PEG-DMG)、または 1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン (DSG-PEG 2000) である、請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 5】

前記 LNP が、ジステアロイル-sn-グリセロ-ホスホエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジパルミトイルホスファチジルコリン (DPPC)、ジオレオイルホスファチジルグリセロール (DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (POPE)、ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン 4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (DOPE-mal)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイルホスファチジルエタノールアミン (DSPE)、モノメチルホスファチジルエタノールアミン、ジメチルホスファチジルエタノールアミン、18-1-トランス PE、1-ステアロイル-2-オレオイルホスファチジエタノールアミン (SOPPE)、水素化ダイズホスファチジルコリン (HSPC)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、ジオレオイルホスファチジルセリン (DOPS)、スフィンゴミエリン (SM)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG)、ジエルコイルホスファチジルコリン (DEPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール (POPG)、ジェラドイルホスファチジルエタノールアミン (DEPE)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DLPE)、1,2-ジフィタノイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DPHYPE)、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン (ESM)、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジン酸、セレブロシド、ジセチルホスフェート、リゾホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、およびそれらの混合物からなる群から選択される非カチオン性脂質をさらに含む、請求項 1~4 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 6】

前記非カチオン性脂質が、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、およびジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン (DOPE) からなる群から選択される、請求項 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 7】

前記モノメチルホスファチジルエタノールアミンが 16-O-モノメチル PE である、または前記ジメチルホスファチジルエタノールアミンが 16-O-ジメチル PE である、請求項 5 に記載の薬学的組成物。

【請求項 8】

前記 PEG または PEG-脂質コンジュゲートが、約 1.5%~約 3% で存在する；
前記ステロールがコレステロールであり、前記コレステロールが、約 20%~約 40%、もしくは約 30%~約 50% のモルパーセンテージで存在する；かつ／または
前記 SS 切断可能脂質が、約 80%~約 60%、もしくは約 50% のモルパーセンテージで存在する、
請求項 3 に記載の薬学的組成物。

【請求項 9】

前記組成物が、コレステロール、PEG または PEG-脂質コンジュゲート、および非カチオン性脂質を含み、

10

20

30

40

50

前記 S S 切断可能脂質が、約 42.5%～約 62.5% のモルパーセンテージで存在する；

前記 P E G または P E G - 脂質コンジュゲートが、約 1.5%～約 3% で存在する；

前記 コレステロールが、約 30%～約 50% のモルパーセンテージで存在する；かつ／または

前記非カチオン性脂質が、約 2.5%～約 12.5% のモルパーセンテージで存在する、請求項 1～2 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 10】

前記 コレステロールが、約 40% のモルパーセンテージで存在し、前記 S S 切断可能脂質が、約 52.5% のモルパーセンテージで存在し、前記非カチオン性脂質が、約 7.5% のモルパーセンテージで存在し、前記 P E G または P E G - 脂質コンジュゲートが、約 3% で存在する、請求項 9 に記載の薬学的組成物。

【請求項 11】

前記 L N P の直径が約 50 nm～約 110 nm である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 12】

前記 L N P の直径が約 100 nm 未満である、請求項 1～10 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 13】

前記組成物が、約 15:1、約 30:1、約 40:1 または約 50:1 の全脂質対 c e D N A 比を有する、請求項 1～12 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

前記組成物が、N - アセチルガラクトサミン (G a l N A c) をさらに含む、請求項 1～13 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 15】

前記 c e D N A が、閉端直鎖状二重鎖 D N A であり、前記 c e D N A が、プロモーター配列および導入遺伝子を含む発現カセットを含む、請求項 1～14 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 16】

前記 c e D N A が、前記発現カセットの 5' または 3' 末端のいずれかに隣接する少なくとも 1 つの逆位末端反復 (I T R) を含む、請求項 15 に記載の薬学的組成物。

【請求項 17】

前記発現カセットが、2 つの I T R に隣接し、隣接する前記 2 つの I T R が、1 つの 5' I T R および 1 つの 3' I T R を含む、請求項 16 に記載の薬学的組成物。

【請求項 18】

前記 5' I T R もしくは前記 3' I T R のうちの少なくとも 1 つが、野生型 A A V I T R である；

前記 5' I T R もしくは前記 3' I T R のうちの少なくとも 1 つが、修飾型 I T R である；かつ／または

前記 5' I T R および前記 3' I T R が対称 I T R である、もしくは非対称 I T R である、請求項 16 に記載の薬学的組成物。

【請求項 19】

前記隣接する I T R の少なくとも 1 つが、A A V 血清型に由来する I T R、ガチョウウイルスの I T R に由来する I T R、B 19 ウイルス I T R に由来する I T R、およびパルボウイルスに由来する野生型 I T R からなる群から選択される、請求項 16 に記載の薬学的組成物。

【請求項 20】

前記 c e D N A が、C E L i D、D N A ベースのミニサークル、M I D G E、ミニストリング D N A、発現カセットの 5' および 3' 末端に I T R の 2 つのヘアピン構造を含むダンベル型の直鎖状二重鎖閉端 D N A、および d o g g y b o n e (商標) D N A からなる

10

20

30

40

50

群から選択される、請求項 1～19 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 21】

対象における遺伝性障害を治療する方法において使用するための、請求項 1～20 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 22】

前記遺伝性障害が、メラノーマ、血友病 A（凝固因子 VII（FVII）欠損症）および血友病 B（凝固因子 IX（FIX）欠損症）、嚢胞性線維症（CFTR 欠損症）、家族性高コレステロール血症（LDL 受容体欠損症）、肝芽細胞腫、ウィルソン病、フェニルケトン尿症（PKU）、先天性肝性ポルフィリン症、遺伝性肝代謝障害、レッシュ・ナイハン症候群、鎌状赤血球貧血症、サラセミア、色素性乾皮症、ファンconi 貧血、網膜色素変性症、毛細血管拡張性運動失調症、ブルーム症候群、網膜芽細胞腫、ムコ多糖蓄積症（例えば、ハーラー症候群（MPS I 型）、シャイエ症候群（MPS IS 型）、ハーラー・シャイエ症候群（MPS IHS 型）、ハンター症候群（MPS II 型）、サンフィリップ A、B、C、および D 型（MPS III A、B、C、および D 型）、モルキオ A および B 型（MPS IVA および MPS IVB）、マロトーラミー症候群（MPS VI 型）、スライ症候群（MPS VII 型）、ヒアルロニダーゼ欠損症（MPS IX 型））、ニーマンピック病 A/B、C1 および C2 型、ファブリー病、シンドラー病、GM2-ガングリオシドーシス II 型（サンドホフ病）、テイサックス病、異染性白質ジストロフィー、クラッペ病、ムコリピドーシス I、II/III および IV 型、シアリドーシス I および II 型、グリコーゲン蓄積症 I および II 型（ポンペ病）、ゴーシェ病 I、II および III 型、ファブリー病、シスチン症、バッテン病、アスパルチルグルコサミン尿症、サラ病、ダノン病（LAMP-2 欠損症）、リソソーム酸性リパーゼ（LAL）欠損症、神経セロイドリポフスチン症（CLN1-8、INCL、および LINCL）、スフィンゴリピドーシス、ガラクトシアリドーシス、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、フリードライヒ運動失調症、デュシェンヌ筋ジストロフィー（DMD）、ベッカー筋ジストロフィー（BMD）、ジストロフィー表皮水疱症（DEB）、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ 1 欠損症、乳児期の全身性動脈石灰化（GACI）、レーバー先天性黒内障（LCA）、シュタルガルト黄斑ジストロフィー（ABCA4 欠損症）、オルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠損症、アッシャー症候群、アルファー 1 アンチトリプシン欠損症、ならびにカテプシン A 欠損症からなる群から選択される、請求項 21 に記載の薬学的組成物。

【請求項 23】

前記方法が免疫抑制剤を投与することをさらに含む、請求項 21 または請求項 22 に記載の薬学的組成物。

【請求項 24】

前記対象が、主要なカチオン性脂質として MC3 を含む LNP で薬学物組成物の投与後に観察された免疫応答レベルと比較して、前記薬学的組成物に対して低下した免疫応答レベルを示し、前記薬学的組成物に対する前記免疫応答レベルが、MC3 を含む前記 LNP で観察された前記レベルよりも少なくとも 50% 低い、請求項 21～23 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【請求項 25】

前記 SS 切断可能脂質および前記閉端 DNA（ceDNA）を含む前記 LNP が、貪食されないか、または同様の条件で投与された主要なカチオン性脂質として MC3 を含む LNP の食作用レベルと比較して、少なくとも 50% 低下した食作用レベルを示す、請求項 21～24 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願

10

20

30

40

50

本出願は、2019年9月6日に出願された米国仮出願第62/896,980号、2019年10月4日に提出された米国仮出願第62/910,720号、および2019年11月25日に提出された米国仮出願第62/940,104号に対する優先権を主張し、それらの各々の内容は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表

本出願は、ASCII形式で電子的に提出された配列表を含む。2020年9月3日に作成された当該ASCIIコピーは、131698-07520__SL.txtという名前であり、サイズは556バイトである。

【背景技術】

【0003】

遺伝子療法は、異常な遺伝子発現プロファイルによって引き起こされる遺伝性障害または後天性疾患のいずれかに罹患している患者についての臨床成績を向上することを目的とする。疾患を治療するための薬剤として治療用核酸を患者の細胞に送達する様々な種類の遺伝子療法がこれまでに開発されてきた。一般に、遺伝子療法は、欠陥遺伝子または異常な調節もしくは発現、例えば、障害、疾患、または悪性腫瘍をもたらす得る過小発現または過剰発現に起因する病状の治療または予防を含む。例えば、欠陥遺伝子によって引き起こされる疾患または障害は、欠陥遺伝子を補足し、遺伝子の野生型コピーを提供することによって遺伝子の野生型コピーを強化するために、対象に修復遺伝物質を送達することによって治療され得る。場合によっては、翻訳レベルの転写で欠陥遺伝子の発現を調節する治療用核酸分子の送達によって治療が達成され、標的DNAもしくはmRNAに結合して、欠陥遺伝子の発現レベルを低下させるアンチセンス核酸を提供するか、または野生型mRNAを転写して遺伝子の正しいコピーを増やすことによるいずれかである。

【0004】

特に、ヒト単一遺伝子障害は、標的細胞への正常遺伝子の送達および発現によって治療されている。患者の標的細胞への修復遺伝子の導入および発現は、操作されたウイルス遺伝子送達ベクター、および潜在的にプラスミド、ミニ遺伝子、オリゴヌクレオチド、ミニサークル、または様々な閉端DNAの使用を含む、多くの方法を介して実行され得る。利用可能な多くのウイルス由来ベクター（例えば、組換えレトロウイルス、組換えレンチウイルス、組換えアデノウイルスなど）の中で、組換えアデノ随伴ウイルス（rAAV）は、遺伝子療法において汎用的、かつ比較的安全なベクターとして受け入れられている。しかしながら、アデノ随伴ベクターなどのウイルスベクターは、免疫原性が高く、特に再投与に関して有効性を損なう可能性のある体液性免疫および細胞性免疫を誘発し得る。

【0005】

AAVウイルスゲノム／ベクターにコードされている分子配列および構造的特徴は、進化して、エピソームの安定性、ウイルス遺伝子の発現を促進し、宿主の免疫系と相互作用するようになる。AAVベクターは、AAVファミリー全体で保存されたヘアピンDNA構造を含有し、AAVの重要な機能、宿主の監視システムから回避しながら、宿主のゲノムを利用して複製する能力において重要な役割を果たす。

【0006】

しかしながら、これらの遺伝子療法の中には、治療用核酸に対する宿主自身の防御メカニズムに密接に関連している免疫関連の有害事象に大きく悩まされるものがある。例えば、免疫系は、療法の受け手に有害事象を引き起こすことに関与する感染症と戦うための2つの一般的なメカニズムを有する。1番目は「自然」免疫応答として知られており、典型的には感染から数分以内に引き起こされ、インビボでの病原体の拡散を制限する働きをする。宿主は、多様な範囲の感染性微生物によって発現されるが、宿主には存在しない保存された決定因子を認識し、これらの決定因子は、宿主の自然免疫系のエレメントを刺激して、免疫調節性サイトカインおよび多反応性IgM抗体を産生する。2番目以降のメカニズムは、「適応」または抗原特異的免疫応答として知られており、典型的には、病原体によって独自に発現される決定因子に対して生成される。自然免疫応答および適応免

10

20

30

40

50

疫応答は、主に、特定の種類の核酸によって活性化される一連のシグナル伝達経路を介して、一連のⅠ型インターフェロン（ⅠＦＮ）によって活性化および調節される。

【０００７】

非ウイルス遺伝子送達は、ウイルス形質導入に関連する特定の不利な点、特にベクター粒子を形成するウイルス構造タンパク質に対する体液性および細胞性免疫応答、ならびに任意の新規ウイルス遺伝子発現に起因する不利な点を回避する。非ウイルス遺伝子導入は典型的には、細菌性プラスミドを使用して外来ＤＮＡをレシピエント細胞に導入する。目的の導入遺伝子に加えて、このようなＤＮＡは、抗生物質耐性遺伝子および原核生物の複製起源など、細菌のプラスミドＤＮＡ（ｐＤＮＡ）の選択および増幅に必要な外来性の配列エレメントを日常的に含有する。例えば、*E. coli*で生成されたプラスミドは、原核生物のＤＮＡ複製の起源および選択可能なマーカーなど、原核生物での増殖に必要なエレメント、ならびに哺乳動物細胞における導入遺伝子の発現に対して不要であり、有害であり得るＤＮＡに対する独自の原核生物の修飾を含有する。

10

【０００８】

概念的には明解だが、ヒト疾患を治療するための遺伝子療法に核酸分子を使用する見通しは、不確かなままである。この不確実性の主な原因は、核酸治療薬に対する宿主の自然免疫応答に関する明らかな有害事象であり、したがって、これらの材料が免疫応答の文脈においてそれらの意図された標的の発現を調節する方法である。臨床応用のために採用され得る核酸分子の作成、機能、挙動および最適化を取り巻く技術の現況は、特に次の点に焦点を当てている：（１）翻訳および遺伝子発現を直接調節するアンチセンスオリゴヌクレオチドおよび二重鎖ＲＮＡ、（２）長期的なエピジェネティック修飾をもたらす転写型遺伝子サイレンシングＲＮＡ、（３）遺伝子スプライシングパターンと相互作用し、それらを改変するアンチセンスオリゴヌクレオチド、（４）天然に存在するＡＡＶまたはレンチウイルスゲノムの生理学的機能を模倣する合成ベクターまたはウイルスベクターの作成、ならびに（５）治療用オリゴヌクレオチドのインビボ送達。しかしながら、最近の臨床成果において明らかである核酸治療薬の開発が進歩しているにもかかわらず、遺伝子療法の分野は、治療用核酸自体によって誘起されるレシピエントの望ましくない有害事象によって依然厳しく限定される。

20

【０００９】

したがって、この分野では、核酸治療薬によって引き起こされる免疫応答系を効果的に低減、改善、軽減、予防または維持する新技術に対する強いニーズがある。

30

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【００１０】

本明細書で提供されるのは、カチオン性脂質、例えば、イオン化可能なカチオン性脂質、例えば、ＳＳ切断可能脂質、および目的の標的部位（例えば、細胞、組織、器官など）にカプシド不含非ウイルス性ＤＮＡベクターを送達するために使用され得るカプシド不含非ウイルス性ベクター（例えば、*ceDNA*）を含む薬学的組成物、ならびにそれらの使用および製造方法である。驚くべきことに、本明細書に示されるように、切断可能脂質を含む脂質ナノ粒子（*LNP*）は、標的細胞（例えば、肝細胞を含む）への治療用核酸、例えば、*ceDNA*のより効率的な送達を提供する。特に、*ceDNA*および切断可能脂質を含む*ceDNA*粒子は、例えば、*MC3*などの他の脂質と比較して、同等のタンパク質発現を示す肝臓組織試料コピーが少なくなった。メカニズムはまだ決定されておらず、理論に束縛されるものではないが、ＳＳ切断可能脂質を含む脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）を含有する*ceDNA*は、非実質細胞と比較して肝細胞への送達を改善し、核へより効率的に輸送すると考えられる。本明細書に記載の切断可能脂質を含む*ceDNA*脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）の別の利点は、体重減少の低減およびサイトカイン放出の減少によって示される、他の脂質（例えば、他のイオン化可能なカチオン性脂質、例えば、*MC3*）と比較してより良好な忍容性である。忍容性に対する有益な効果は、免疫抑制剤コンジュゲート（例えば、パルミチン酸デキサメタゾン）または組織特異的リガンド（例

40

50

10

20

30

CCCCCCCCC/C=C\CCCCCCCCC(=O)Oc1ccc(cc1)C(=O)OCCN2CCCCC2SCSSC3CCN(CCC3)C(=O)Oc4ccc(cc4)C(=O)OCCN5CCCCC5

40

50

ジルーエタノールアミン (D S P E)、モノメチルーホスファチジルエタノールアミン (16-O-モノメチル P E など)、ジメチルーホスファチジルエタノールアミン (16-O-ジメチル P E など)、18-1-トランス P E、1-ステアロイル-2-オレオイル-ホスファチジエタノールアミン (S O P E)、水素化ダイズホスファチジルコリン (H S P C)、卵ホスファチジルコリン (E P C)、ジオレオイルホスファチジルセリン (D O P S)、スフィンゴミエリン (S M)、ジミリストイルホスファチジルコリン (D M P C)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (D M P G)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (D S P G)、ジェルコイルホスファチジルコリン (D E P C)、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール (P O P G)、ジェラドイル-ホスファチジルエタノールアミン (D E P E)、1, 2-ジラウロイル-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン (D L P E)、1, 2-ジフィタノイル (d i p h y t a n o y l)-sn-グリセロール-3-ホスホエタノールアミン (D P H y P E)、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジリンシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン (E S M)、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジカシド、セレブロシド、ジセチルホスフェート、リゾホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、またはそれらの混合物からなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、非カチオン性脂質は、ジオレオイルホスファチジルコリン (D O P C)、ジステアロイルホスファチジルコリン (D S P C)、およびジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン (D O P E) からなる群から選択される。

【0013】

いくつかの実施形態によれば、PEGまたはPEG-脂質コンジュゲートは、約1.5%~約3%、例えば約1.5%~約2.75%、約1.5%~約2.5%、約1.5%~約2.25%、約1.5%~約2%、約1.5%~約1.75%、約2%~約3%、約2%~約2.75%、約2%~約2.5%、約2%~約2.25%で存在する。いくつかの実施形態によれば、PEGまたはPEG-脂質コンジュゲートは、約1.5%、約1.6%、約1.7%、約1.8%、約1.9%、約2%、約2.1%、約2.2%、約2.3%、約2.4%、約2.5%、約2.6%、約2.7%、約2.8%、約2.9%または約3%で存在する。いくつかの実施形態によれば、コレステロールは、約20%~約40%、例えば約20%~約35%、約20%~約30%、約20%~約25%、約25%~約35%、約25%~約30%または約30%~約35%のモルパーセンテージで存在し、SS切断可能脂質は、約80%~約60%、例えば約80%~約65%、約80%~約70%、約80%~約75%、約75%~約60%、約75%~約65%、約75%~約70%、約70%~約60%または約70%~約60%のモルパーセンテージで存在する。いくつかの実施形態によれば、コレステロールは、約20%~約40%、例えば約20%、約21%、約22%、約23%、約24%、約25%、約26%、約27%、約28%、約29%、約30%、約31%、約32%、約33%、約34%、約35%、約36%、約37%、約38%、約39%または約40%のモルパーセンテージで存在し、SS切断可能脂質は、約80%~約60%、例えば約80%、約79%、約78%、約77%、約76%、約75%、約74%、約73%、約72%、約71%、約70%、約69%、約68%、約67%、約66%、約65%、約64%、約63%、約62%、約61%または約60%のモルパーセンテージで存在する。いくつかの実施形態によれば、コレステロールは、約40%のモルパーセンテージで存在し、SS切断可能脂質は、約50%のモルパーセンテージで存在する。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、組成物は、コレステロール、PEGまたはPEG-脂質コンジュゲート、および非カチオン性脂質をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、PEGまたはPEG-脂質コンジュゲートは、約1.5%~約3%、例えば約1.5%~約2.75%、約1.5%~約2.5%、約1.5%~約2.25%、約1.5%~約2%、約2%~約3%、約2%~約2.75%、約2%~約2.5%、約2%~約2.25%、約2.25%~約3%、約2.25%~約2.75%または約2.25%~約2.5%で存

10

20

30

40

50

在する。いくつかの実施形態によれば、PEGまたはPEG-脂質コンジュゲートは、約1.5%、約1.6%、約1.7%、約1.8%、約1.9%、約2%、約2.1%、約2.2%、約2.3%、約2.4%、約2.5%、約2.6%、約2.7%、約2.8%、約2.9%または約3%で存在する。いくつかの実施形態によれば、コレステロールは、約30%~約50%、例えば約30%~約45%、約30%~約40%、約30%~約35%、約35%~約50%、約35%~約45%、約35%~約40%、約40%~約50%または約45%~約50%のモルパーセンテージで存在する。いくつかの実施形態によれば、コレステロールは、約30%、約31%、約32%、約33%、約34%、約35%、約36%、約37%、約38%、約39%、約40%、約41%、約42%、約43%、約44%、約45%、約46%、約47%、約48%、約49%または約50%のモルパーセンテージで存在する。いくつかの実施形態によれば、SS切断可能脂質は、約42.5%~約62.5%のモルパーセンテージで存在する。いくつかの実施形態によれば、SS切断可能脂質は、約42.5%、約43%、約43.5%、約44%、約44.5%、約45%、約45.5%、約46%、約46.5%、47.5%、約48%、約48.5%、約49%、約49.5%、約50%、約50.5%、約51%、約51.5%、約47%約52%、約52.5%、約53%、約53.5%、約54%、約54.5%、約55%、約55.5%、約56%、約56.5%、約57%、57.5%、約58%、約58.5%、約59%、約59.5%、約60%、約60.5%、約61%、約61.5%、約62%または約62.5%のモルパーセンテージで存在する。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、非カチオン性脂質は、約2.5%~約12.5%のモルパーセンテージで存在する。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、コレステロールは、約40%のモルパーセンテージで存在し、SS切断可能脂質は、約52.5%のモルパーセンテージで存在し、非カチオン性脂質は、約7.5%のモルパーセンテージで存在し、PEGは、約3%で存在する。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、組成物は、パルミチン酸デキサメタゾンを含む。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、LNPは、直径が約50nm~約110nm、例えば約50nm~約100nm、約50nm~約95nm、約50nm~約90nm、約50nm~約85nm、約50nm~約80nm、約50nm~約75nm、約50nm~約70nm、約50nm~約65nm、約50nm~約60nm、約50nm~約55nm、約60nm~約110nm、約60nm~約100nm、約60nm~約95nm、約60nm~約90nm、約60nm~約85nm、約60nm~約80nm、約60nm~約75nm、約60nm~約70nm、約60nm~約65nm、約70nm~約110nm、約70nm~約100nm、約70nm~約95nm、約70nm~約90nm、約70nm~約85nm、約70nm~約80nm、約70nm~約75nm、約80nm~約110nm、約80nm~約100nm、約80nm~約95nm、約80nm~約90nm、約80nm~約85nm、約90nm~約110nm、または約90nm~約100nmの範囲のサイズにある。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、LNPは、サイズが約100nm未満、例えばサイズが約105nm未満、約100nm未満、約95nm未満、約90nm未満、約85nm未満、約80nm未満、約75nm未満、約70nm未満、約65nm未満、約60nm未満、約55nm未満、約50nm未満、約45nm未満、約40nm未満、約35nm未満、約30nm未満、約25nm未満、約20nm未満、約15nm未満または約10nm未満である。いくつかの実施形態によれば、LNPは、サイズが約70nm未満、例えばサイズが約65nm未満、約60nm未満、約55nm未満、約50nm未満、約45nm未満、約40nm未満、約35nm未満、約30nm未満、約25nm未満、約20nm未満、約15nm未満または約10nm未満である。いくつかの実施形態によれば、LNPは、サイズが約60nm未満、例えばサイズが約55nm未満、約50nm未満、約45nm未満、約40nm未満、約35nm未満、約30nm未満、約25nm未満、約20nm未満、約15nm未満または約10nm未満である

10

20

30

40

50

。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、組成物は、約15：1の全脂質対ceDNA比を有する。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、組成物は、約30：1の全脂質対ceDNA比を有する。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、組成物は、約40：1の全脂質対ceDNA比を有する。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、組成物は、約50：1の全脂質対ceDNA比を有する。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、組成物は、N-アセチルガラクトサミン（GalNAc）をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、GalNAcは、全脂質の0.2%のモルパーセンテージでLNP中に存在する。いくつかの実施形態によれば、GalNAcは、全脂質の0.3%のモルパーセンテージでLNP中に存在する。いくつかの実施形態によれば、GalNAcは、全脂質の0.4%のモルパーセンテージでLNP中に存在する。いくつかの実施形態によれば、GalNAcは、全脂質の0.5%のモルパーセンテージでLNP中に存在する。いくつかの実施形態によれば、GalNAcは、全脂質の0.6%のモルパーセンテージでLNP中に存在する。いくつかの実施形態によれば、GalNAcは、全脂質の0.7%のモルパーセンテージでLNP中に存在する。いくつかの実施形態によれば、GalNAcは、全脂質の0.8%のモルパーセンテージでLNP中に存在する。いくつかの実施形態によれば、GalNAcは、全脂質の0.9%のモルパーセンテージでLNP中に存在する。いくつかの実施形態によれば、GalNAcは、全脂質の1.0%のモルパーセンテージでLNP中に存在する。いくつかの実施形態によれば、GalNAcは、全脂質の約1.5%のモルパーセンテージでLNP中に存在する。いくつかの実施形態によれば、GalNAcは、全脂質の2.0%のモルパーセンテージでLNP中に存在する。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、組成物は、約10mM～約30mMのリンゴ酸、例えば、約10mM～約25mM、約10mM～約20mM、約10mM～約15mM、約15mM～約25mM、約15mM～約20mM、約20mM～約25mMをさらに含む。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、組成物は、約10mMのリンゴ酸、約11mMのリンゴ酸、約12mMのリンゴ酸、約13mMのリンゴ酸、約14mMのリンゴ酸、約15mMのリンゴ酸、約16mMのリンゴ酸、約17mMのリンゴ酸、約18mMのリンゴ酸、約19mMのリンゴ酸、約20mMのリンゴ酸、21mMのリンゴ酸、約22mMのリンゴ酸、約23mMのリンゴ酸、約24mMのリンゴ酸、約25mMのリンゴ酸、約26mMのリンゴ酸、約27mMのリンゴ酸、約28mMのリンゴ酸、約29mMのリンゴ酸、または約30mMのリンゴ酸をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、組成物は、約20mMのリンゴ酸を含む。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、組成物は、約30mM～約50mMのNaCl、例えば約30mM～約45mMのNaCl、約30mM～約40mMのNaCl、約30mM～約35mMのNaCl、約35mM～約45mMのNaCl、約35mM～約40mMのNaClまたは約40mM～約45mMのNaClをさらに含む。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、組成物は、約30mMのNaCl、約35mMのNaCl、約40mMのNaClまたは約45mMのNaClをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、組成物は、約40mMのNaClを含む。いくつかの実施形態によれば、組成物は、約20mM～約100mMのMgCl₂、例えば約20mM～約90mMのMgCl₂、約20mM～約80mMのMgCl₂、約20mM～約70mMのMgCl₂、約20mM～約60mMのMgCl₂、約20mM～約50mMのMgCl₂、約20mM～約40mMのMgCl₂、約20mM～約30mMのMgCl₂、約320mM～約90mMのMgCl₂、約30mM～約80mMのMgCl₂、約30mM～約70mMのMgCl₂、約30mM～約60mMのMgCl₂、約30mM～約50mMのMgCl₂、約30mM～約40mMのMgCl₂、約40mM～約90mMのMgCl₂、約40mM～約80mMのMgCl₂、約40mM～約70mMのMgCl₂、約40mM～約

10

20

30

40

50

60 mMのMgCl₂、約40 mM～約50 mMのMgCl₂、約50 mM～約90 mMのMgCl₂、約50 mM～約80 mMのMgCl₂、約50 mM～約70 mMのMgCl₂、約50 mM～約60 mMのMgCl₂、約60 mM～約90 mMのMgCl₂、約60 mM～約80 mMのMgCl₂、約60 mM～約70 mMのMgCl₂、約70 mM～約90 mMのMgCl₂、約70 mM～約80 mMのMgCl₂または約80 mM～約90 mMのMgCl₂をさらに含む。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、ceDNAは、閉端直鎖状二重鎖DNAである。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、ceDNAは、プロモーター配列および導入遺伝子を含む発現カセットを含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNAは、ポリアデニル化配列を含む発現カセットを含む。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、ceDNAは、当該発現カセットの5'または3'末端のいずれかに隣接する少なくとも1つの逆位末端反復(ITSR)を含む。いくつかの実施形態によれば、発現カセットは、2つのITSRに隣接し、2つのITSRは、1つの5'ITSRおよび1つの3'ITSRを含む。いくつかの実施形態によれば、発現カセットは、3'末端でITSR(3'ITSR)に連結される。いくつかの実施形態によれば、発現カセットは、5'末端でITSR(5'ITSR)に連結される。いくつかの実施形態によれば、5'ITSRおよび3'ITSRのうちの少なくとも1つは、野生型AAVITSRである。いくつかの実施形態によれば、5'ITSRおよび3'ITSRのうちの少なくとも1つは、修飾型ITSRである。いくつかの実施形態によれば、ceDNAは、5'ITSRと発現カセットとの間にスペーサー配列をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNAは、3'ITSRと発現カセットとの間にスペーサー配列をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、スペーサー配列は、長さが少なくとも5塩基対の長さである。いくつかの実施形態によれば、スペーサー配列は、長さが少なくとも5～100塩基対の長さである。いくつかの実施形態によれば、スペーサー配列は、長さが5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95または100塩基対の長さである。いくつかの実施形態によれば、スペーサー配列は、長さが5～500塩基対の長さである。いくつかの実施形態によれば、スペーサー配列は、長さが5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、205、210、215、220、225、230、235、240、245、250、255、260、265、270、275、280、285、290、295、300、305、310、315、320、325、330、335、340、345、350、355、360、365、370、375、380、385、390、395、400、405、410、415、420、425、430、435、440、445、450、455、460、465、470、475、480、485、490または495塩基対の長さである。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、ceDNAは、ニックまたはギャップを有する。いくつかの実施形態によれば、ITSRは、AAV血清型に由来するITSRであり、ガチョウウイルスのITSRに由来し、B19ウイルスITSRに由来し、パルボウイルスからの野生型ITSRである。いくつかの実施形態によれば、AAV血清型は、AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11およびAAV12からなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、ITSRは、変異体ITSRであり、ceDNAは、第1のITSRとは異なる追加のITSRを任意選択的に含む。いくつかの実施形態によれば、ceDNAは、発現カセットの5'および3'末端の両方に2つの変異体ITSRを含み、任意選択的に、2つの変異体ITSRは、対称変異体である。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、ceDNAは、CELID、DNAベースのミニサークル、MIDGE、ミニスタリング(ministering)DNA、発現カセットの5'および3'末端にITSRの2つのヘアピン構造を含むダンベル型の直鎖状二重

10

20

30

40

50

鎖閉端DNA、またはdoggy bone（商標）DNAである。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、薬学的組成物は、薬学的に許容される賦形剤をさらに含む。

【0014】

いくつかの態様によれば、本開示は、対象における遺伝性障害を治療する方法を提供し、この方法は、本明細書の態様または実施形態のいずれかによる有効量の薬学的組成物を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態によれば、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、鎌状赤血球貧血症、メラノーマ、血友病A（凝固因子VIII（FVIII）欠損症）および血友病B（凝固因子IX（FIX）欠損症）、囊胞性線維症（CFTR）、家族性高コレステロール血症（LDL受容体欠損症）、肝芽細胞腫、ウィルソン病、フェニルケトン尿症（PKU）、先天性肝性ポルフィリン症、遺伝性肝代謝障害、レッシュナイハン症候群、鎌状赤血球貧血症、サラセミア、色素性乾皮症、ファンconi貧血、網膜色素変性症、毛細血管拡張性運動失調症、ブルーム症候群、網膜芽細胞腫、ムコ多糖蓄積症（例えば、ハーラー症候群（MPS I型）、シャイエ症候群（MPS II型）、ハーラーシャイエ症候群（MPS IH型）、ハンター症候群（MPS III型）、サンフィリップA、B、C、およびD型（MPS IVAおよびMPS

IVB）、マロトーラミー症候群（MPS VI型）、スライ症候群（MPS VII型）、ヒアルロニダーゼ欠損症（MPS IX型）、ニーマンピック病A/B、C1およびC2型、ファブリー病、シンドラー病、GM2-ガングリオシドーシスII型（サンドホフ病）、テイサックス病、異染性白質ジストロフィー、クラッペ病、ムコリピドーシスI、II/IIIおよびIV型、シアリドーシスIおよびII型、グリコーゲン蓄積症IおよびII型（ポンペ病）、ゴーシェ病I、IIおよびIII型、ファブリー病、シスチン症、バッテン病、アスパルチルグルコサミン尿症、サラ病、ダノン病（LAMP-2欠損症）、リソソーム酸性リパーゼ（LAL）欠損症、神経セロイドリポフスチン症（CLN1-8、INCL、およびLINCL）、スフィンゴリピドーシス、ガラクトシアリドーシス、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、フリードライヒ運動失調症、デュシェンヌ筋ジストロフィー（DMD）、ベッカー筋ジストロフィー（BMD）、ジストロフィー表皮水疱症（DEB）、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ1欠損症、乳児期の全身性動脈石灰化（GACI）、レーバー先天性黒内障、シュタルガルト黄斑ジストロフィー（ABCA4）、オルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠損症、アッシャー症候群、アルファ-1アンチトリプシン欠損症、ならびにカテプシンA欠損症からなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、レーバー先天性黒内障（LCA）である。いくつかの実施形態によれば、LCAは、LCA10である。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、ニーマンピック病である。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、シュタルガルト黄斑ジストロフィーである。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、グルコース-6-ホスファターゼ（G6Pase）欠損症（グリコーゲン蓄積症I型）またはポンペ病（グリコーゲン蓄積症II型）である。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、血友病A（因子VIII欠損症）である。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、血友病B（因子IX欠損症）である。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、ハンター症候群（ムコ多糖症II型）である。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、囊胞性線維症である。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、ジストロフィー表皮水疱症（DEB）である。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、フェニルケトン尿症（PKU）である。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、ヒアルロニダーゼ欠損症である。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、この方法は、免疫抑制剤を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、免疫抑制剤は、デキサメタゾンである。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、対象は、主要なカチオン性脂質としてMC3を含むLNPで観察された免疫応答レベルと比較して、薬学的組成

10

20

30

40

50

物に対して低下した免疫応答レベルを示し、薬学的組成物に対する免疫応答レベルは、MC3を含むLNPで観察されたレベルよりも少なくとも50%低い。いくつかの実施形態によれば、免疫応答は、炎症誘発性サイトカインまたはケモカインのレベルを検出することによって測定される。いくつかの実施形態によれば、炎症誘発性サイトカインまたはケモカインは、IL-6、IFN α 、IFN γ 、IL-18、TNF α 、IP-10、MCP-1、MIP1 α 、MIP1 β 、およびRANTESからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、炎症誘発性サイトカインのうちの少なくとも1つは、薬学的組成物の投与の6時間後に対象の血清中で検出可能なレベル未満である。本明細書の態様または実施形態のうちのいずれかのいくつかの実施形態によれば、SS切断可能脂質および閉端DNA (ceDNA)を含むLNPは、貪食されないか、または同様の条件で投与された主要なカチオン性脂質としてMC3を含むLNPの食作用レベルと比較して、少なくとも50%低下した食作用レベルを示す。いくつかの実施形態によれば、SS切断可能脂質は、式Iのss-OPである。いくつかの実施形態によれば、LNPは、コレステロールおよびPEG-脂質コンジュゲートをさらに含む。いくつかの実施形態によれば、LNPは、非カチオン性脂質をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、非カチオン性脂質は、ジオレオイルホスファチジルコリン(DOPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン(DSPC)、およびジオレオイル-ホスファチジリエタノールアミン(DOPE)からなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、LNPは、N-アセチルガラクトサミン(GalNAc)をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、GalNAcは、全脂質の0.5%のモルパーセンテージでLNP中に存在する。

【0015】

別の態様によれば、本開示は、治療用核酸による治療を必要とする対象における補体応答を軽減する方法を提供し、この方法は、治療用核酸、ss切断可能脂質、ステロール、ならびにポリエチレングリコール(PEG)およびN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を含む有効量の脂質ナノ粒子(LNP)を対象に投与することを含む。いくつかの実施形態によれば、対象は、遺伝性障害に罹患している。いくつかの実施形態によれば、遺伝性障害は、鎌状赤血球貧血症、メラノーマ、血友病A(凝固因子VIII(FVIII)欠損症)および血友病B(凝固因子IX(FIX)欠損症)、囊胞性線維症(CFTR)、家族性高コレステロール血症(LDL受容体欠損症)、肝芽細胞腫、ウィルソン病、フェニルケトン尿症(PKU)、先天性肝性ポルフィリン症、遺伝性肝代謝障害、レッシュナイハン症候群、鎌状赤血球貧血症、サラセミア、色素性乾皮症、ファンconi貧血、網膜色素変性症、毛細血管拡張性運動失調症、ブルーム症候群、網膜芽細胞腫、ムコ多糖蓄積症(例えば、ハーラー症候群(MPS I型)、シャイエ症候群(MPS IS型)、ハーラーシャイエ症候群(MPS IHS型)、ハンター症候群(MPS II型)、サンフィリップA、B、C、およびD型(MPS III A、B、C、およびD型)、モルキオAおよびB型(MPS IVAおよびMPS IVB)、マロトーラミー症候群(MPS VI型)、スライ症候群(MPS VII型)、ヒアルロニダーゼ欠損症(MPS IX型)、ニーマンピック病A/B、C1およびC2型、ファブリー病、シンドラー病、GM2-ガングリオシドーシスII型(サンドホフ病)、テイサックス病、異染色性白質ジストロフィー、クラッペ病、ムコリピドーシスI、II/IIIおよびIV型、シアリドーシスIおよびII型、グリコーゲン蓄積症IおよびII型(ポンペ病)、ゴーシェ病I、IIおよびIII型、ファブリー病、シスチン症、バッテン病、アスパルチルグルコサミン尿症、サラ病、ダノン病(LAMP-2欠損症)、リソソーム酸性リパーゼ(LAL)欠損症、神経セロイドリポフスチン症(CLN1-8、INCL、およびLINCL)、スフィンゴリピドーシス、ガラクトシアリドーシス、筋萎縮性側索硬化症(ALS)、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、フリードライヒ運動失調症、デュシェンヌ筋ジストロフィー(DMD)、ベッカー筋ジストロフィー(BMD)、ジストロフィー表皮水疱症(DEB)、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ1欠損症、乳児期の全身性動脈石灰化(GACI)、レーバー先天性黒内障、シュタルガルト黄斑ジストロフィー(ABCA4)、オルニチントランスカルバ

ミラーゼ（O T C）欠損症、アッシャー症候群、アルファー１アンチトリプシン欠損症、ならびにカテプシンA欠損症からなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、治療用核酸は、ミニ遺伝子、プラスミド、ミニサークル、低分子干渉RNA（s i RNA）、マイクロRNA（m i RNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（A S O）、リボザイム、c e DNA、ミニストリング、d o g g y b o n e（商標）、プロテロメア閉端DNA、またはダンベル直鎖状DNA、ダイサー基質d s RNA、低分子ヘアピンRNA（s h RNA）、非対称干渉RNA（a i RNA）、マイクロRNA（m i RNA）、m RNA、t RNA、r RNA、DNAウイルスベクター、ウイルスRNAベクター、非ウイルスベクター、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、c e DNAは、C E L i D、M I D G E、ミニスタリングDNA、発現カセットの5'および3'末端にI T Rの2つのヘアピン構造を含むダンベル型の直鎖状二重鎖閉端DNA、またはd o g g y b o n e（商標）DNAからなる群から選択され、c e DNAは、カプシド不含および直鎖状二重鎖DNAである。いくつかの実施形態によれば、P E Gは、1-（モノメトキシ-ポリエチレングリコール）-2，3-ジミリスチルグリセロール（P E G-D M G）である。いくつかの実施形態によれば、P E Gは、約2%~4%、例えば、約2%~約3.5%、約2%~約3%、約2%~約2.5%、約2.5%~約4%、約2.5%~約3.5%、約2.5%~約3%、約3%~約4%、約3.5%~約4%、または約2%、約2.25%、約2.5%、約2.75%、約3%、約3.25%、約3.5%、約3.75%もしくは約4%の分子パーセンテージでL N P中に存在する。いくつかの実施形態によれば、P E Gは、約3%の分子パーセンテージでL N P中に存在する。いくつかの実施形態によれば、L N Pは、非カチオン性脂質をさらに含む。いくつかの実施形態によれば、非カチオン性脂質は、ジオレオイルホスファチジルコリン（D O P C）、ジステアロイルホスファチジルコリン（D S P C）、およびジオレオイル-ホスファチジエタノールアミン（D O P E）からなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、G a l N A cは、全脂質の約0.3~1%のモルパーセンテージ、例えば全脂質の約0.3%~約0.9%、約0.3%~約0.8%、約0.3%~約0.7%、約0.3%~約0.6%、約0.3%~約0.5%、約0.3%~約0.4%、約0.4%~約0.9%、約0.4%~約0.8%、約0.4%~約0.7%、約0.4%~約0.6%、約0.4%~約0.5%、約0.5%~約0.9%、約0.5%~約0.8%、約0.5%~約0.7%、約0.5%~約0.6%、約0.6%~約0.9%、約0.6%~約0.8%、約0.6%~約0.7%、約0.7%~約0.9%、約0.7%~約0.8%、約0.8%~約0.9%、または全脂質の約0.3%、約0.4%、約0.5%、約0.6%、約0.7%、約0.8%、約0.9%または約1%のモルパーセンテージでL N P中に存在する。いくつかの実施形態によれば、G a l N A cは、全脂質の約0.5%のモルパーセンテージでL N P中に存在する。

【0016】

上記に簡単に要約され、以下により詳細に考察される本開示の実施形態は、添付の図面に描かれた本開示の例示的な実施形態を参照することによって理解することができる。しかしながら、添付の図面は、本開示の典型的な実施形態のみを示し、したがって、本開示は他の等しく有効な実施形態を認めることができるため、範囲を限定するものとみなされるべきではない。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1A】非対称I T Rを含む、本明細書に開示される導入遺伝子の発現のためのc e DNAベクターの例示的な構造を示す。この実施形態では、例示的なc e DNAベクターは、C A Gプロモーター、W P R E、およびB G H p Aを含有する発現カセットを含む。導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム（O R F）は、C A GプロモーターとW P R Eとの間のクローニング部位（R 3/R 4）に挿入され得る。発現カセットは、2つの逆位末端反復（I T R）-発現カセットの上流（5'端）の野生型A A V 2 I T Rおよび下流（3'端）の修飾型I T Rに隣接しており、したがって、発現カセットに隣接す

る2つのITRは、互いに対して非対称である。

【図1B】CAGプロモーター、WP RE、およびBGHP Aを含有する発現カセットを有する非対称ITRを含む、本明細書に開示される導入遺伝子の発現のためのceDNAベクターの例示的な構造を示す。導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)は、CAGプロモーターとWP REとの間のクローニング部位に挿入され得る。発現カセットは、2つの逆位末端反復(ITR) – 発現カセットの上流(5'端)の修飾型ITRおよび下流(3'端)の野生型ITRに隣接している。

【図1C】エンハンサー／プロモーター、導入遺伝子、転写後エレメント(WP RE)、およびポリAシグナルを含有する発現カセットを有する非対称ITRを含む、本明細書に開示される導入遺伝子の発現のためのceDNAベクターの例示的な構造を示す。オープンリーディングフレーム(ORF)は、CAGプロモーターとWP REとの間のクローニング部位への目的のタンパク質をコードする導入遺伝子、または治療用核酸の挿入を可能にする。発現カセットは、互いに対して非対称である2つの逆位末端反復(ITR)、発現カセットの上流(5'端)の修飾型ITRおよび下流(3'端)の修飾型ITRに隣接しており、5'ITRおよび3'ITRの両方は、修飾型ITRであるが、異なる修飾を有する(すなわち、同じ修飾を有しない)。

【図1D】CAGプロモーター、WP RE、およびBGHP Aを含有する発現カセットを有する、本明細書で定義される対称な修飾型ITRまたは実質的に対称な修飾型ITRを含む、本明細書に開示される導入遺伝子の発現のためのceDNAベクターの例示的な構造を示す。導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)は、CAGプロモーターとWP REとの間のクローニング部位に挿入される。発現カセットは、5'修飾型ITRおよび3'修飾型ITRが対称または実質的に対称である、2つの修飾型逆位末端反復(ITR)に隣接している。

【図1E】エンハンサー／プロモーター、導入遺伝子、転写後エレメント(WP RE)、およびポリAシグナルを含有する発現カセットを有する、本明細書で定義される対称な修飾型ITRまたは実質的に対称な修飾型ITRを含む、本明細書に開示される導入遺伝子の発現のためのceDNAベクターの例示的な構造を示す。オープンリーディングフレーム(ORF)は、CAGプロモーターとWP REとの間のクローニング部位への導入遺伝子の挿入を可能にする。発現カセットは、5'修飾型ITRおよび3'修飾型ITRが対称または実質的に対称である、2つの修飾型逆位末端反復(ITR)に隣接している。

【図1F】CAGプロモーター、WP RE、およびBGHP Aを含有する発現カセットを有する、本明細書で定義される対称なWT-ITRまたは実質的に対称なWT-ITRを含む、本明細書に開示される導入遺伝子の発現のためのceDNAベクターの例示的な構造を示す。導入遺伝子をコードするオープンリーディングフレーム(ORF)は、CAGプロモーターとWP REとの間のクローニング部位に挿入される。発現カセットは、5'WT-ITRおよび3'WT-ITRが対称または実質的に対称である、2つの野生型逆位末端反復(WT-ITR)に隣接している。

【図1G】エンハンサー／プロモーター、導入遺伝子、転写後エレメント(WP RE)、およびポリAシグナルを含有する発現カセットを有する、本明細書で定義される対称な修飾型ITRまたは実質的に対称な修飾型ITRを含む、本明細書に開示される導入遺伝子の発現のためのceDNAベクターの例示的な構造を示す。オープンリーディングフレーム(ORF)は、CAGプロモーターとWP REとの間のクローニング部位への導入遺伝子の挿入を可能にする。発現カセットは、5'WT-ITRおよび3'WT-ITRが対称または実質的に対称である、2つの野生型逆位末端反復(WT-ITR)に隣接している。

【図2A】A-A'アーム、B-B'アーム、C-C'アーム、2つのRep結合部位(RBEおよびRBE')の同定とともに野生型左ITRのT形ステムループ構造を提供し、末端分解部位(trs)も示す。RBEは、Rep78またはRep68のいずれかと相互作用すると考えられる一連の4つの二重四量体を含有する。加えて、RBE'はまた、構築物中の野生型ITRまたは変異型ITR上でアセンブリしたRep複合体と相互作用すると考えられる。DおよびD'領域は、転写因子結合部位および他の保存構造を含有する。

【図 2 B】A-A' アーム、B-B' アーム、C-C' アーム、2つの Rep 結合部位 (RBE および RBE') の特定とともに AAV2 の野生型左 ITR の T 形ステムループ構造を含む、野生型左 ITR 中の提案された Rep 触媒ニッキングおよびライゲーション活性を示し、また末端分解部位 (trs)、ならびにいくつかの転写因子結合部位を含む D および D' 領域ならびに他の保存構造も示す。

【図 3 A】野生型左 AAV2 ITR の A-A' アーム、ならびに C-C' および B-B' アームの RBE 含有部分の一次構造 (ポリヌクレオチド配列) (左) ならびに二次構造 (右) を提供する。

【図 3 B】左 ITR についての例示的な変異型 ITR (修飾型 ITR とも称される) 配列を示す。例示的な変異型左 ITR (ITR-1、左) の A-A' アーム、C アーム、および B-B' アームの RBE 部分の一次構造 (左) および予測された二次構造 (右) が示される。

10

【図 3 C】野生型右 AAV2 ITR の A-A' ループ、ならびに B-B' および C-C' アームの RBE 含有部分の一次構造 (左) ならびに二次構造 (右) を示す。

【図 3 D】例示的な右修飾型 ITR を示す。例示的な変異体右 ITR (ITR-1、右) の A-A' アーム、ならびに B-B' および C アームの RBE 含有部分の一次構造 (左) および予測された二次構造 (右) が、示される。左および右の ITR (例えば、AAV2 ITR または他のウイルス血清型もしくは合成 ITR) の任意の組み合わせを、本明細書で教示されるように使用することができる。図 3 A ~ 3 D ポリヌクレオチド配列の各々は、本明細書に記載される ceDNA を産生するために使用されるプラスミドまたはバクミド/バキュロウイルスゲノム中で使用される配列を指す。プラスミドまたはバクミド/バキュロウイルスゲノム中の ceDNA ベクター構成および予測された Gibbs 自由エネルギー値から推定される対応する ceDNA 二次構造もまた、図 3 A ~ 3 D の各々に含まれる。

20

【図 4 A】図 4 B の概略図に記載されるプロセスにおける、本明細書に開示される導入遺伝子の発現のための ceDNA ベクターの産生に有用である、バキュロウイルス感染した昆虫細胞 (BIIIC) を作製するための上流プロセスを示す概略図である。

【図 4 B】ceDNA の産生の例示的な方法の概略図である。

【図 4 C】ceDNA ベクターの産生を確認するための生化学的方法およびプロセスを示す。

30

【図 4 D】【図 4 D および図 4 E】図 4 B の ceDNA 産生プロセス中に取得された細胞ペレットから採取された DNA 中の ceDNA の存在を同定するためのプロセスを説明する概略図である。図 4 D は、左が未切断であるか、または制限エンドヌクレアーゼで消化された後、未変性ゲルまたは変性ゲルのいずれかで電気泳動に供される例示的な ceDNA の概略的予想バンドを示す。左端の概略図は、未変性ゲルであり、その二重鎖および未切断形態で、ceDNA が少なくとも単量体および二量体状態で存在し、より速く移動する小さい単量体および単量体のサイズの 2 倍である、より遅く移動する二量体として見えることを示唆する、多重バンドを示す。左から 2 番目の概略図は、ceDNA が制限エンドヌクレアーゼで切断された場合、元のバンドが消え、切断後に残存する予想断片サイズに対応する、より速く移動する (例えば、より小さな) バンドが出現することを示す。変性条件下、元の二重鎖 DNA は一本鎖であり、相補鎖が共有結合されるため、未変性ゲル上で観察されるものより 2 倍大きい種として移動する。したがって、右から 2 番目の概略図において、消化された ceDNA は、未変性ゲル上で観察されるものと同様のバンディング分布を示すが、バンドは、未変性ゲル対応物のサイズの 2 倍の断片として移動する。右端の概略図は、変性条件下の未切断の ceDNA が、一本鎖開環として移動し、したがって観察されたバンドは、環が開いていない未変性条件下で観察されるもののサイズの 2 倍であることを示す。この図において、「kb」を使用して、文脈に応じて、ヌクレオチド鎖の長さ (例えば、変性状態で観察される単鎖分子の場合) または塩基対の数 (例えば、未変性状態で観察される二本鎖分子の場合) に基づくヌクレオチド分子の相対サイズを示す。図 4 E は、非連続的な構造を有する DNA を示す。ceDNA は、ceDNA ベク

40

50

ター上に単一認識部位を有する制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、中性条件および変性条件の両方において、異なるサイズ（1 kb および 2 kb）を有する2つのDNA断片を生成することができる。図4Eはまた、直鎖状かつ連続的な構造を有するceDNAを示す。ceDNAベクターは、制限エンドヌクレアーゼによって切断され得、中性条件において1 kb および 2 kb として移動する2つのDNA断片を生成することができるが、変性条件では、鎖は、連結されたままであり、2 kb および 4 kb として移動する一本鎖を産生する。

【図4E】同上。

【図5】封入効率を示すグラフであり、封入されていないceDNAの含有量を決定することによって測定される（PicoGreen（Thermo Scientific）をLNPスラリー（Cfree）に添加したときの蛍光を測定し、この値を1% Triton（登録商標）X-100（Ctotal）によるLNPの溶解のときに得られた総ceDNA含有量と比較することによる、封入率 = $(C_{total} - C_{free}) / C_{total} \times 100$ ）。

10

【図6A】【図6Aおよび図6B】上記の図5に記載されているように、封入されていないceDNA含有量を決定することによって測定された封入効率を示す。粒子サイズおよび封入率に対するpHおよび塩条件の効果を評価した。図6Aは、pH4での粒子サイズおよび封入率への効果を示す。図6Bは、pH3での粒子サイズおよび封入率への効果を示す。図6Aおよび図6Bに示されるように、脂質粒子サイズは、直径が約70 nm～120 nmで変化した。これらの条件では、80%～90%の封入率を達成した。

20

【図6B】同上。

【図7】実施例7に記載の例示的なceDNA LNPの体重への効果を示すグラフである。

【図8】ceDNA LNP群の各々（MC3：ポリC、MC3：ceDNA-luc、ss-Paz3：ポリC、ss-Paz3：ceDNA-luc、ss-Paz3：ceDNA-luc+dexPalm、ss-Paz4：ポリC、ss-Paz4：ceDNA-luc、ss-OP3：ポリC、ss-OP3：ceDNA-luc、ss-OP4：ポリC、ss-OP4：ceDNA-luc）におけるルシフェラーゼ活性（総フラックス／光子／秒）を経時的に示すグラフである。

【図9】MC3 LNP、ss-Paz3、ss-Paz4、ss-OP3またはss-OP4 LNPで処理されたマウスの肝臓qPCRで検出されたceDNA発現（二倍体ゲノム当たりのceDNAコピー）を示すグラフである。

30

【図10A】【図10Aおよび図10B】マウスの血清中のサイトカインおよびケモカインレベル（pg/ml）に対する実施例7に記載のceDNA LNP中のss切断可能脂質の効果を示す。

【図10B】同上。

【図11】ceDNA LNP群の各々（MC3：ポリC、MC3：ceDNA-luc、ss-OP4：ポリC、ss-OP4：ceDNA-luc）におけるルシフェラーゼ活性（総フラックス／光子／秒）を経時的に示すグラフである。

【図12A】0.5 mg/kgまたは2.0 mg/kgで投与された例示的なceDNA LNP（脂質モル%によるss-OP4±0.5%GalNAc）で処理されたマウスの体重への効果を示すグラフである。

40

【図12B】ceDNA-lucの発現レベルに対する、ss-OP4-ceDNA製剤中のGalNAc（ss-OP4：Gのように、全脂質重量の0.5%モルパーセンテージで存在するGalNAc）の存在の効果を示す。

【図13】ss-OP4またはGalNAcを有するss-OP4で処理されたマウスの血清中のサイトカインおよびケモカインレベル（pg/ml）に対する実施例8に記載のceDNA LNP中のss切断可能脂質の効果を示す。

【図14】0.1% DiD（DiIC18（5）、1, 1'-ジオクタデシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドジカルボシアニン、4-クロロベンゼンスルホン酸塩）親油

50

性カルボシアニン色素で処理した *ceDNA* LNP の食作用アッセイの概略図を示し、10% ヒト血清 (+ 血清) の存在下または非存在下で、MC3、MC3-5DSG、または *ss-OP4* LNP に異なる濃度の *ceDNA* (200 ng、500 ng、1 μ g および 2 μ g) を使用した。

【図15】MC3、MC3-5DSG、または *ss-OP4* 脂質を LNP として使用した、0.1% DiD (DiIC18 (5)、1, 1'-ジオクタデシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドジカルボシアニン、4-クロロベンゼンスルホン酸塩) 親油性カルボシアニン色素で処理した *ceDNA* LNP の画像を示す。貪食細胞は赤く見えるが、画像では暗い領域として見ることができる。

【図16】0.1% DiD (DiIC18 (5)、1, 1'-ジオクタデシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドジカルボシアニン、4-クロロベンゼンスルホン酸塩) 親油性カルボシアニン色素で処理した *ceDNA* LNP の画像を示す。貪食細胞は赤く見えるが、画像では暗い領域として見ることができる。

【図17】*ss-OP4*、MC3-5DSG、および MC3 LNP の食作用の定量化 (赤色のオブジェクト数 / コンフルエンス% による) を示すグラフである。

【図18A】pH 7.4 および pH 6.0 での *ceDNA-ss-OP4* LNP のエンドソーム放出または脱出を示すグラフである。

【図18B】脾臓のコピー数より肝臓のコピー数で測定した肝臓の *ceDNA-luc* の定量化を示す。

【図19】試験サル血清中の補体カスケードタンパク質 C3a および C5b9 (pg / ml) に対する、*ss-OP4 + GalNAc* LNP で製剤化された *ceDNA* の効果を示す。

【図20】試験サル血清中の *INF α* および *INF β* サイトカインレベル (pg / ml) に対する、*ss-OP4 + GalNAc* LNP で製剤化された *ceDNA* の効果を示す。

【図21】試験サル血清中の *INF γ* および *IL-1 β* サイトカインレベル (pg / ml) に対する、*ss-OP4 + GalNAc* LNP で製剤化された *ceDNA* の効果を示す。

【図22】試験サル血清中の *IL-6* および *IL-18* サイトカインレベル (pg / ml) に対する、*ss-OP4 + GalNAc* LNP で製剤化された *ceDNA* の効果を示す。

【図23】試験サル血清中の *TNF α* サイトカインレベル (pg / ml) に対する、*ss-OP4 + GalNAc* LNP で製剤化された *ceDNA* の効果を示す。

【図24】ラットにおける *ss-OP4 / fLuc mRNA* および *ss-OP4 / ceDNA-CpG* 最小化ルシフェラーゼ (*ceDNA-luc*) の網膜下注射の効果を示す。

【図25】ラットの右眼 (OD) および左眼 (OS) における *ssOP4 / fLuc mRNA* および *ssOP4 / ceDNA-CpG* 最小化ルシフェラーゼ (*ceDNA-luc*) の網膜下注射の効果の代表的な IVIS 画像を示す。

【図26】*ceDNA-luc* の発現レベルに対する、*ss-OP4-ceDNA* 製剤の静脈内 (IV) または皮下 (SC) 投与の効果を示す。

【図27】マウスの血清中のサイトカインおよびケモカインレベル (平均濃度、pg / ml) に対する、*ss-OP4-ceDNA* 製剤の静脈内 (IV) または皮下 (SC) 投与の効果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本開示は、ウイルスカプシド成分なしで細胞の細胞質から核に移動することができる核酸、例えば、治療核酸 (TNA)、例えば、閉端 DNA (*ceDNA*) を送達するための脂質ベースのプラットフォームを提供する。ウイルスベクターベースの遺伝子療法に関連する免疫原性は、既存のバックグラウンド免疫のために患者の数を顕著に制限し、患者の再投与を予防した。既存の免疫が欠如しているため、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子

）を含有する本明細書中に記載する治療用核酸は、必要に応じて治療用核酸の追加用量を可能にし、成長に応じて後続の投与を必要とし得る小児集団を含む患者アクセスをさらに拡大させる。さらに、1つ以上の三級アミノ基を有する切断可能脂質を含む脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）およびジスルフィド結合を含有する治療用核酸は、改善された忍容性および安全性プロファイルを有する治療用核酸の効率的な送達を提供することが本開示の発見である。本明細書中に記載する脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）を含有する治療用核酸は、ウイルスカプシド内の空間によって課されるパッケージングの制約がないため、理論的には、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）を含有する治療用核酸の唯一のサイズ制限は、宿主細胞のDNA複製効率に存在する。

【0019】

本明細書に記載および例示されるように、治療用核酸は、閉端DNA（ceDNA）であり得る。いくつかの実施形態によれば、治療用核酸は、mRNAであり得る。

【0020】

I. 定義

本明細書で別途定義されない限り、本出願に関連して使用される科学および技術的用語は、本開示が属する技術分野における当業者によって一般に理解される意味を有するものとする。本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、および試薬などに限定されず、そのようなものとして変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される用語法は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであり、単に特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定することを意図されない。免疫学および分子生物学における一般的な用語の定義は、The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, 19th Edition, published by Merck Sharp & Dohme Corp., 2011 (ISBN 978-0-911910-19-3)、Robert S. Porter et al. (eds.), Fields Virology, 6th Edition, published by Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA (2013)、Knipe, D. M. and Howley, P. M. (ed.), The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine, published by Blackwell Science Ltd., 1999-2012 (ISBN 9783527600908)、およびRobert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, published by VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8)、Immunology by Werner Luttmann, published by Elsevier, 2006、Janeway's Immunobiology, Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (eds.), Taylor & Francis Limited, 2014 (ISBN 0815345305, 9780815345305)、Lewin's Genes XI, published by Jones & Bartlett Publishers, 2014 (ISBN-1449659055)、Michael Richard Green and Joseph Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., USA (2012) (ISBN 1936113414)、Davis et al. Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier Science Publishing, Inc., New York, USA (2012) (ISBN 044460149X)、Laboratory Methods in Enzymology: DNA, Jon Lorsch (ed.) Elsevier, 2013 (ISBN 0124199542)、Current Protocols

10

20

30

40

50

in Molecular Biology (CPMB), Frederick M. Ausubel (ed.), John Wiley and Sons, 2014 (ISBN 047150338X, 9780471503385)、Current Protocols in Protein Science (CPPS), John E. Coligan (ed.), John Wiley and Sons, Inc., 2005、および Current Protocols in Immunology (CPI) (John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strober, (eds.) John Wiley and Sons, Inc., 2003 (ISBN 0471142735, 9780471142737))に見出すことができ、これらの内容はすべて、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0021】

本明細書および添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、および「the」は、内容が別途明らかに示さない限り、複数の指示対象を含む。

【0022】

略語「例えば (e. g.)」は、ラテン語の *exempli gratia* に由来し、本明細書では非限定例を示すように使用される。したがって、略語「例えば (e. g.)」は、「例えば (for example)」と同義である。

【0023】

代替案（例えば、「または」）の使用は、代替案のいずれか一方、両方、またはそれらの任意の組み合わせを意味すると理解されたい。

20

【0024】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、量、時間的持続時間などの測定可能な値を指す場合、開示された方法を実施するのに適切であるように指定の値から $\pm 20\%$ または $\pm 10\%$ 、より好ましくは $\pm 5\%$ 、さらにより好ましくは $\pm 1\%$ 、さらにより好ましくは $\pm 0.1\%$ の変動を包含することを意味する。

【0025】

本明細書で使用される場合、任意の濃度範囲、パーセンテージ範囲、比率範囲、または整数範囲は、別途明記しない限り、列挙された範囲内の任意の整数の値、および適切な場合にはその端数（整数の10分の1および100分の1など）を含むと理解されるべきである。

30

【0026】

本明細書で使用される場合、「含む (comprise)」、「含む (comprising)」、および「含む (comprises)」、および「含む (comprise of)」は、「含む (include)」、「含む (including)」、「含む (includes)」、または「含有する (contain)」、「含有する (containing)」、「含有する (contains)」という用語と同義であることを意味し、例えば、成分に続くものの存在を指定する包括的または自由形式の用語であり、当該技術分野において既知であるか、またはそこに開示されている、追加の、引用されていない成分、特徴、エレメント、メンバー、ステップの存在を除外または排除しない。

40

【0027】

「からなる」という用語は、実施形態の説明において列挙されていないいずれのエレメントも除いた、本明細書に記載される組成物、方法、プロセス、およびそれらそれぞれの構成成分を指す。

【0028】

本明細書で使用される場合、「から本質的になる」という用語は、所与の実施形態に必要なエレメントを指す。この用語は、本発明の実施形態の基本的かつ新規または機能的な特徴に物質的に影響を及ぼさない追加のエレメントの存在を許容する。

【0029】

本明細書で使用される場合、「など」、「例えば」などの用語は、例示的な実施形態を

50

指すことを意図しており、本開示の範囲を限定するものではない。

【0030】

別途定義されない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載されるものと同様または同等の方法および材料を、本発明の試験のための実施において使用することができるが、好適な材料および方法は、本明細書に記載される。

【0031】

本明細書で使用される場合、「投与」、「投与する」という用語およびその変形は、組成物または薬剤（例えば、核酸、特に c e D N A）を対象に導入することを指し、1つ以上の組成物または薬剤の同時で連続的な導入を含む。「投与」は、例えば、治療、薬物動態、診断、研究、プラセボ、および実験方法を指し得る。「投与」は、インビトロおよびエキスピボ治療も包含する。組成物または薬剤の対象への導入は、経口、肺、鼻腔内、非経口（静脈内、筋肉内、腹腔内、または皮下）、直腸、リンパ管内、腫瘍内、または局所を含む任意の好適な経路による。投与には、自己管理および他者による投与が含まれる。投与は、任意の好適な経路によって実行され得る。好適な投与経路は、組成物または薬剤がその意図された機能を遂行することを可能にする。例えば、好適な経路が静脈内である場合、組成物は、組成物または薬剤を対象の静脈に導入することによって投与される。

【0032】

本明細書で使用される場合、「抗治療用核酸免疫応答」、「抗転移ベクター免疫応答」、「治療用核酸に対する免疫応答」、「転移ベクターに対する免疫応答」などの句は、その起源がウイルス性または非ウイルス性の治療用核酸に対する任意の望ましくない免疫応答を指すことを意味する。いくつかの実施形態では、望ましくない免疫応答は、ウイルス転移ベクター自体に対する抗原特異的免疫応答である。いくつかの実施形態では、免疫応答は、二本鎖 D N A、一本鎖 R N A、または二本鎖 R N A であり得る転移ベクターに特異的である。他の実施形態では、免疫応答は、転移ベクターの配列に特異的である。他の実施形態では、免疫応答は、転移ベクターの C p G 含有量に特異的である。

【0033】

本明細書で使用される場合、「水溶液」という用語は、全体または一部に水を含む組成物を指すことを意味する。

【0034】

本明細書で使用される場合、「塩基」には、プリンおよびピリミジンが含まれ、それらには、天然化合物のアデニン、チミン、グアニン、シトシン、ウラシル、イノシン、および天然類似体、ならびにプリンおよびピリミジンの合成誘導体がさらに含まれ、それらには、アミン、アルコール、チオール、カルボキシレート、およびアルキルハライドなどであるがこれらに限定されない新しい反応基を配置する修飾が含まれるが、これらに限定されない。

【0035】

本明細書で使用される場合、「担体」という用語は、任意かつすべての溶媒、分散媒、ビヒクル、コーティング、希釈剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤、緩衝剤、担体溶液、懸濁液、コロイドなどを含むことを意味する。医薬活性物質に対するそのような媒質および薬剤の使用は、当該技術分野において周知である。補充的活性成分を組成物に組み込むこともできる。「薬学的に許容される」という句は、宿主に投与された場合に、毒性反応、アレルギー性反応、または同様の不都合な反応を生じない分子実体および組成物を指す。

【0036】

本明細書で使用される場合、「c e D N A」という用語は、合成またはその他の非ウイルス遺伝子導入のためのカプシド不含閉端直鎖状二本鎖（d s）デュプレックス D N A を指すことを意味する。いくつかの実施形態によれば、c e D N A は、閉端直鎖状二重鎖（C E L i D）C E L i D D N A である。いくつかの実施形態によれば、c e D N A は、D N A ベースのミニサークルである。いくつかの実施形態によれば、c e D N A は、最小

限の免疫学的に定義された遺伝子発現（MIDGE）ベクターである。いくつかの実施形態によれば、ceDNAは、ミニタリングDNAである。いくつかの実施形態によれば、ceDNAは、発現カセットの5'および3'末端にITRの2つのヘアピン構造を含むダンベル型の直鎖状二重鎖閉端DNAである。いくつかの実施形態によれば、ceDNAは、doggybone（商標）DNAである。ceDNAの詳細な説明は、2017年3月3日に出願されたPCT/US2017/020828の国際出願に記載されており、その全内容は参照により本明細書に明示的に組み込まれる。細胞ベースの方法を使用して様々な逆位末端反復（ITR）配列および構成を含むceDNAの産生のためのある特定の方法は、2018年9月7日に提出された国際出願第18/49996号および2018年12月6日に提出された同第2018/064242号の実施例1に記載されており、その各々は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。様々なITR配列および構成を含む合成ceDNAベクターの産生のためのある特定の方法は、例えば、2019年1月18日に提出された国際出願第2019/14122号に記載されており、その全内容は参照により本明細書に組み込まれる。

【0037】

本明細書で使用される場合、「閉端DNAベクター」という用語は、少なくとも1つの共有結合性閉端を有し、ベクターの少なくとも一部が分子内二重鎖構造を有する、カプシド不含DNAベクターを指す。

【0038】

本明細書で使用される場合、「ceDNAベクター」および「ceDNA」という用語は、交換可能に使用され、少なくとも1つの末端パリンドロームを含む閉端DNAベクターを指す。いくつかの実施形態では、ceDNAは、2つの共有結合性閉端を含む。

【0039】

本明細書で使用される場合、「ceDNA-バクミド」という用語は、E. coliにおいてプラスミドとして伝播することができる分子間二重鎖としてceDNAゲノムを含み、それによりバキュロウイルスのシャトルベクターとして作動し得る、感染性バキュロウイルスゲノムを指すことを意味する。

【0040】

本明細書で使用される場合、「ceDNA-バキュロウイルス」という用語は、バキュロウイルスゲノム内の分子間二重鎖としてceDNAゲノムを含むバキュロウイルスを指すことを意味する。

【0041】

本明細書で使用される場合、「ceDNA-バキュロウイルス感染昆虫細胞」および「ceDNA-BIIC」という用語は、交換可能に使用され、ceDNA-バキュロウイルスに感染した無脊椎動物宿主細胞（限定されないが、昆虫細胞（例えば、Sf9細胞）を含む）を指すことを意味する。

【0042】

本明細書で使用される場合、「ceDNAゲノム」という用語は、少なくとも1つの逆位末端反復領域をさらに組み込む発現カセットを指すことを意味する。ceDNAゲノムは、1つ以上のスペーサー領域をさらに含み得る。いくつかの実施形態では、ceDNAゲノムは、DNAの分子間二重鎖ポリヌクレオチドとして、プラスミドまたはウイルスゲノムに組み込まれる。

【0043】

本明細書で使用される場合、「DNA調節配列」、「制御エレメント」、および「調節エレメント」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、プロモーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル、ターミネーター、タンパク質分解シグナルなどの転写および翻訳制御配列を指すことを意味し、これらは非コード配列（例えば、DNA標的化RNA）またはコード配列（例えば、部位特異的修飾ポリペプチドもしくはCas9/Csn1ポリペプチド）の転写を提供および／もしくは調節し、かつ／またはコードされたポリペプチドの翻訳を調節する。

【0044】

本明細書で使用される場合、活性剤または治療用核酸などの治療剤の「有効量」または「治療有効量」という句は、治療用核酸の不在下で検出された発現レベルと比較して、所望の効果、例えば、標的配列の発現の阻害をもたらすのに十分な量である。標的遺伝子または標的配列の発現を測定するための好適なアッセイは、例えば、ドットプロット、ノーザンブロット、インサイチュハイブリダイゼーション、ELISA、免疫沈降、酵素機能、同様に当業者に既知の表現型アッセイなどの、当業者に既知の技法を使用するタンパク質またはRNAレベルの検査を含む。

【0045】

本明細書で使用される場合、「外因性」という用語は、その天然源以外の細胞中に存在する物質を指すことを意味する。本明細書で使用される「外因性」という用語は、通常見られず、核酸またはポリペプチドをそのような細胞または生物に導入することが望まれる、人の手が関与するプロセスによって細胞または生物などの生物系に導入された核酸（例えば、ポリペプチドをコードする核酸）またはポリペプチドを指し得る。代替的に、「外因性」とは、それが比較的少量で見られ、細胞または生物における核酸またはポリペプチドの量を増加させること、例えば、異所性発現またはレベルをもたらすことが望まれる、人の手が関与するプロセスによって細胞または生物などの生物系に導入された核酸またはポリペプチドを指し得る。これとは対照的に、本明細書で使用される場合、「内因性」という用語は、生物系または細胞に対して天然である物質を指す。

【0046】

本明細書で使用される場合、「発現」という用語は、RNAおよびタンパク質、また必要に応じて、例えば、転写、転写処理、翻訳およびタンパク質の折りたたみ、修飾および処理を含むがこれらに限定されない分泌タンパク質の産生に関与する細胞プロセスを指すことを意味する。本明細書で使用される場合、「発現産物」という句は、遺伝子（例えば、導入遺伝子）から転写されたRNA、および遺伝子から転写されたmRNAの翻訳によって得られたポリペプチドを含む。

【0047】

本明細書で使用される場合、「発現ベクター」という用語は、ベクター上の転写調節配列に連結された配列からのRNAまたはポリペプチドの発現を指示するベクターを指すことを意味する。発現される配列は、多くの場合、宿主細胞に対して異種であるが、必ずしもそうではない。発現ベクターは、追加の要素を含むことができ、例えば、発現ベクターは、2つの複製系を有することができるため、それを2つの生物、例えば発現の場合はヒト細胞、ならびにクローニングおよび増幅の場合は原核生物宿主で維持することができる。発現ベクターは、組換えベクターであり得る。

【0048】

本明細書で使用される場合、「発現カセット」および「発現ユニット」という用語は、交換可能に使用され、DNAベクター、例えば、合成AAVベクターの導入遺伝子の転写を指示するのに十分なプロモーターまたは他のDNA調節配列に操作可能に連結される異種DNA配列を指すことを意味する。好適なプロモーターには、例えば、組織特異的プロモーターが含まれる。プロモーターは、AAV起源でもあり得る。

【0049】

本明細書で使用される場合、「末端反復」または「TR」という用語は、少なくとも1つの最小限必要な複製起源、およびパリンドロームヘアピン構造を含む領域を含む、任意のウイルスまたは非ウイルス末端配列または合成配列を含む。Rep結合配列（「RBS」またはRep結合エレメント（RBE）とも称される）および末端分解部位（「TRS」）は、一緒にAAVの「最小限必要な複製起源」を構成し、したがって、TRは、少なくとも1つのRBSおよび少なくとも1つのTRSを含む。ポリヌクレオチド配列の所与のストレッチ内で互いの逆相補体であるTRは、典型的に、各々「逆位末端反復」または「ITR」と称される。ウイルスの文脈において、ITRは、複製、ウイルス粒子およびDNAのパッケージング、DNAの組み込み、ならびにゲノムおよびプロウイルスのレス

10

20

30

40

50

キューを媒介するのに重要な役割を果たす。全長にわたって逆相補体（パリンドローム）ではない ITR は、依然として ITR の従来の機能を遂行することができ、したがって、ITR という用語は、宿主細胞内の複製を媒介することができるウイルスまたは非ウイルス AAV ベクター中の ITR を指すために使用される。複合 AAV ベクター構成中、3 つ以上の ITR または非対称 ITR 対が存在し得ることは、当業者によって理解されるであろう。
【0050】

「ITR」は、1 つ以上の望ましい機能的配列（例えば、パリンドローム配列、RBS）を含むオリゴヌクレオチドのセットを使用して人工的に合成することができる。ITR 配列は、AAV ITR、人工の非 AAV ITR、またはウイルス性 AAV ITR に物理的に由来する ITR（例えば、ウイルスゲノムから除去された ITR 断片）であり得る。例えば、ITR は、パルボウイルスおよびディペンドウイルス（例えば、イヌパルボウイルス、ウシパルボウイルス、マウスパルボウイルス、ブタパルボウイルス、ヒトパルボウイルス B-19）を包含するパルボウイルス科に由来し得るか、または SV40 複製の起源として役立つ SV40 ヘアピンは、切断、置換、欠失、挿入、および／もしくは付加によってさらに修飾され得る、ITR として使用され得る。パルボウイルス科ウイルスは、脊椎動物に感染するパルボウイルス亜科および無脊椎動物に感染するデンソウイルス亜科の 2 つの亜科で構成されている。ディペンドパルボウイルスは、ヒト、霊長類、ウシ、イヌ、ウマ、およびヒツジ種を含むが、これらに限定されない脊椎動物宿主における複製が可能である、アデノ随伴ウイルス（AAV）のウイルスファミリーを含む。典型的には、ITR 配列は、野生型、「doggy bone」および「ダンベル型」、対称型または非対称型 ITR 配向の構成で、AAV だけでなく、パルボウイルス、レンチウイルス、ガチョウウイルス、B19 に由来することができる。ITR は典型的には AAV ベクターの 5' および 3' 末端の両方に存在するが、ITR は直鎖状ベクターの一方の末端にのみ存在することができる。例えば、ITR は、5' 末端にのみ存在することができる。他のいくつかのケースでは、ITR は合成 AAV ベクターの 3' 末端にのみ存在することができる。本明細書では便宜上、合成 AAV ベクター中の発現カセットに対して 5'（その上流）に位置する ITR は、「5' ITR」または「左 ITR」と称され、ベクターまたは合成 AAV 中の発現カセットに対して 3'（その下流）に位置する ITR は、「3' ITR」または「右 ITR」と称される。

【0051】

「野生型 ITR」または「WT-ITR」は、例えば、Rep 結合活性および Rep ニッキング能力を維持する、AAV ゲノムまたは他のディペンドウイルスにおける天然に存在する ITR 配列の配列を指す。任意の AAV 血清型からの WT-ITR のヌクレオチド配列は、遺伝コードまたはドリフトの縮退に起因して天然に存在する正準配列とわずかに異なる場合があり、したがって本明細書における使用のために包含される WT-ITR 配列は、天然に存在する変化（例えば、複製エラー）の結果として WT-ITR 配列を含む。

【0052】

本明細書で使用される場合、「実質的に対称な WT-ITR」または「実質的に対称な WT-ITR 対」という用語は、全長にわたって逆相補配列を有する両野生型 ITR である合成 AAV ベクター内の一対の WT-ITR を指す。例えば、変化が配列の物理的および機能的特性ならびに全体的な三次元構造（二次元および三次元構造体）に影響を及ぼさない限り、天然に存在する正準配列から逸脱する 1 つ以上のヌクレオチドを有する場合でも、ITR が野生型の配列であるとみなすことができる。いくつかの態様では、逸脱するヌクレオチドは、保存的配列変化を表す。非限定的な一例として、配列は、正準配列に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性（例えば、デフォルト設定で BLAST を使用して測定される）を有し、またそれらの三次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、他の WT-ITR に対して対称な三次元空間構成を有する。実質的に対称な WT-ITR は、三次元空間で同じ A、C-C'、および B-B' ループを有する。実質的に対称な WT-ITR は、適切な Rep タンパク質と対合する操作可能な Rep 結合部位（RBE または RBE'）および末端分解部位（trs）を有する

ことを決定することによって、WTとして機能的に確認することができる。任意選択的に、許容条件下での導入遺伝子発現を含む他の機能を試験することができる。

【0053】

本明細書で使用される場合、「修飾型ITR」または「mod-ITR」または「変異体ITR」の語句は、交換可能に使用され、同じ血清型からのWT-ITRと比較して、少なくとも1つ以上のヌクレオチドに変異を有するITRを指す。変異は、同じ血清型のWT-ITRの三次元空間構成と比較して、ITRのA、C、C'、B、B'領域のうちの1つ以上の変化をもたらす得、三次元空間構成（すなわち、幾何学的空間におけるその三次元構造）の変化をもたらす得る。

【0054】

本明細書で使用される場合、「非対称ITR対」とも称される「非対称ITR」という用語は、全長にわたって逆相補ではない一本鎖合成AAVゲノム内のITRの対を指す。非限定的な一例として、非対称ITR対は、それらの三次元構造が、幾何学的空間において異なる形状であるように、それらの同族ITRに対して対称の三次元空間構成を有しない。言い換えると、非対称のITR対は、全体的な幾何学的構造が異なり、すなわち、三次元空間でのそれらのA、C-C'、およびB-B'ループの構成が異なる（例えば、同族ITRと比較して、1つのITRは、短いC-C'アームおよび／または短いB-B'アームを有し得る）。2つのITR間の配列の相違は、1つ以上のヌクレオチド付加、欠失、切断、または点変異に起因し得る。一実施形態では、非対称ITR対の一方のITRは、野生型AAV ITR配列であり得、他方のITRは、本明細書で定義される修飾型ITR（例えば、非野生型または合成ITR配列）であり得る。別の実施形態では、非対称ITR対のどちらのITRも野生型AAV配列ではなく、2つのITRは、幾何学的空間において異なる形状（すなわち、異なる全体的な幾何学的構造）を有する修飾型ITRである。いくつかの実施形態では、非対称ITR対の一方のmod-ITRは、短いC-C'アームを有することができ、他方のITRは、それらが同族の非対称mod-ITRと比較して、異なる三次元空間構成を有するように異なる修飾（例えば、単一アーム、または短いB-B'アームなど）を有し得る。

【0055】

本明細書で使用される場合、「対称ITR」という用語は、野生型または変異型（例えば、野生型に対して修飾型）ディペンドウイルスITR配列であり、かつそれらの全長にわたって逆相補である、一本鎖AAVゲノム内の一対のITRを指す。非限定的な一例において、両ITRは、AAV2からの野生型ITR配列である。別の例では、いずれのITRも野生型ITR AAV2配列ではなく（すなわち、それらは、修飾型ITRであり、変異体ITRとも称される）、ヌクレオチドの付加、欠失、置換、切断、または点変異に起因して、野生型ITRとは配列が異なり得る。本明細書では便宜上、合成AAVベクター中の発現カセットに対して5'（その上流）に位置するITRは、「5' ITR」または「左ITR」と称され、合成AAVベクター中の発現カセットに対して3'（その下流）に位置するITRは、「3' ITR」または「右ITR」と称される。

【0056】

本明細書で使用される場合、「実質的に対称な修飾型ITR」または「実質的に対称なmod-ITR対」という用語は、両方がそれらの全長にわたって逆相補配列を有する合成AAV内の一対の修飾型ITRを指す。例えば、修飾型ITRは、変化が特性および全体的な形状に影響を及ぼさない限り、逆相補配列から逸脱するいくつかのヌクレオチド配列がある場合でも、実質的に対称とみなすことができる。非限定的な一例として、配列は、正準配列に対して少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性（デフォルト設定でBLASTを使用して測定される）を有し、またそれらの三次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、それらの同族の修飾型ITRに対して対称な三次元空間構成を有する。言い換えると、実質的に対称な修飾型ITR対は、三次元空間に構成された同じA、C-C'、およびB-B'ループを有する。いくつかの実施形態では、mod-ITR対からのITRは、異なる逆相補ヌクレオチド配列

10

20

30

40

50

を有し得るが、依然として同じ対称な三次元空間構成を有し得る。すなわち、両方の I T R は、同じ全体的な三次元形状をもたらす変異を有する。例えば、mod-I T R 対の 1 つの I T R (例えば、5' I T R) は、1 つの血清型に由来し得、他方の I T R (例えば、3' I T R) は、異なる血清型に由来し得るが、両方が同じ対応する変異を有し得 (例えば、5' I T R が C 領域に欠失を有する場合、異なる血清型の同族の修飾型 3' I T R は、C' 領域の対応する位置に欠失を有する)、それにより修飾型 I T R 対が同じ対称な三次元空間構成を有する。そのような実施形態では、修飾型 I T R 対の各 I T R は、A A V 2 および A A V 6 の組み合わせなどの異なる血清型 (例えば、A A V 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、および 12) に由来し得、1 つの I T R の修飾は、異なる血清型の同族の I T R の対応する位置に反映される。一実施形態では、実質的に対称な修飾型 I T R 対は、I T R 間のヌクレオチド配列の相違が特性または全体的な形状に影響を及ぼさず、それらが三次元空間で実質的に同じ形状を有する限り、一対の修飾型 I T R (mod-I T R) を指す。非限定的な例として、mod-I T R は、B L A S T (B a s i c L o c a l A l i g n m e n t S e a r c h T o o l) またはデフォルト設定の B L A S T N などの当該技術分野において周知の標準的な手段によって決定される、正準 mod-I T R に対して少なくとも 95%、96%、97%、98%、または 99% の配列同一性を有し、またそれらの三次元構造が幾何学的空間で同じ形状になるように、対称な三次元空間構成を有する。実質的に対称な mod-I T R 対は、三次元空間で同じ A、C-C' および B-B' ループを有する。例えば、実質的に対称な mod-I T R 対の修飾型 I T R が C-C' アームの欠失を有する場合、同族の mod-I T R は、C-C' ループの対応する欠失を有し、またその同族の mod-I T R の幾何学的空間に同じ形状の残りの A および B-B' ループの同様の三次元構造を有する。

【0057】

本明細書で使用される場合、「隣接する」という用語は、別の核酸配列に対するある核酸配列の相対位置を指すことを意味する。一般に、配列 A B C では、B の両側に A および C が隣接している。配置 A × B × C についても同様である。したがって、隣接する配列は、隣接される配列の前または後に続くが、隣接される配列と連続している、またはすぐ隣である必要はない。一実施形態では、隣接するという用語は、直鎖状一本鎖合成 A A V ベクターの各末端における末端反復を指す。

【0058】

本明細書で使用される場合、「ギャップ」という用語は、本発明の合成 DNA ベクターの中断された部分を指すことを意味し、その他の二本鎖 c e DNA には一本鎖 DNA 部分のストレッチが作成される。ギャップは、二重鎖 DNA の一本鎖の長さが 1 塩基対 ~ 100 塩基対の長さであり得る。本明細書に記載される方法によって設計および作成された典型的なギャップ、および当該方法によって生成された合成ベクターは、例えば、長さが 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、または 60 b p の長さであり得る。本開示における例示的なギャップは、長さが 1 b p ~ 10 b p の長さ、1 ~ 20 b p の長さ、1 ~ 30 b p の長さであり得る。

【0059】

本明細書で使用される場合、「ニック」という用語は、典型的には損傷または酵素作用による一本鎖の隣接ヌクレオチド間にホスホジエステル結合がない二本鎖 DNA 分子の不連続性を指す。1 つ以上のニックは、DNA 複製中に鎖のねじれの解放を可能にし、ニックはまた、転写機構の結合を促進する役割を果たすと考えられていることが理解される。

【0060】

本明細書で使用される場合、「n e DNA」、「ニックの入った c e DNA」という用語は、1 ~ 100 塩基対のオープンリーディングフレーム (例えば、発現されるプロモーターおよび導入遺伝子) の上流のステム領域またはスペーサー領域のニックまたはギャッ

プを有する閉端DNAを指す。

【0061】

本明細書で使用される場合、「遺伝子」という用語は、インビトロまたはインビボでの所与のRNAまたはタンパク質の発現に関連する核酸の任意のセグメントを指すために広く使用される。したがって、遺伝子には、発現されたRNA（典型的にはポリペプチドコード配列を含む）をコードする領域と、多くの場合、それらの発現に必要な調節配列が含まれる。遺伝子は、目的の供給源からのクローニングまたは既知のもしくは予測された配列情報からの合成を含む、様々な供給源から得ることができ、特に所望のパラメーターを有するように設計された配列を含んでもよい。

【0062】

本明細書で使用される場合、「遺伝子送達」という用語は、外来DNAが遺伝子療法の用途のために宿主細胞に導入されるプロセスを意味する。

【0063】

本明細書で使用される場合、「遺伝性疾患」または「遺伝性障害」という句は、ゲノム中の1つ以上の異常、特に出生時から存在する状態によって部分的または完全に、直接的または間接的に引き起こされる疾患を指すことを意味する。異常は、遺伝子における変異、挿入、または欠失であり得る。異常は、遺伝子のコード配列またはその調節配列に影響を及ぼす可能性がある。

【0064】

本明細書で使用される場合、「異種ヌクレオチド配列」および「導入遺伝子」という用語は、交換可能に使用され、本明細書に開示されるcDNAベクターなどのベクターに組み込まれ、それによって送達および発現され得る、目的の（カプシドポリペプチドをコードする核酸以外の）核酸を指す。異種核酸配列は、天然に存在する核酸配列（またはそのバリエーション）に（例えば、遺伝子操作によって）連結されて、キメラポリペプチドをコードするキメラヌクレオチド配列を生成し得る。異種核酸配列は、バリエーションポリペプチドに（例えば、遺伝子操作によって）連結されて、融合バリエーションポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を生成し得る。

【0065】

本明細書で使用される場合、「相同性」または「相同」という用語は、必要に応じて配列を整列させ、ギャップを導入して最大の配列同一性パーセントを達成した後、標的染色体上の対応する配列のヌクレオチド残基と同一である相同性アームのヌクレオチド残基のパーセンテージを指すことを意味する。ヌクレオチド配列相同性パーセントを決定する目的のためのアラインメントは、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、ClustalW2、またはMegalign (DNASTAR) ソフトウェアなどの公的に入手可能なコンピューターソフトウェアを使用して、当該技術分野の範囲内である様々な方式で達成され得る。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列を整列させるための適切なパラメーターを決定することができる。いくつかの実施形態では、例えば修復テンプレートの相同性アームの核酸配列（例えば、DNA配列）は、配列が、宿主細胞の対応する未変性または未編集の核酸配列（例えば、ゲノム配列）と少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%以上同一である場合、「相同」とみなされる。

【0066】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、本開示の核酸治療剤による形質転換、トランスフェクション、形質導入などを受けやすい任意の細胞型を指す。非限定的な例として、宿主細胞は、単離された初代細胞、多能性幹細胞、CD34⁺細胞、人工多能性幹細胞、またはいくつかの不死化細胞株（例えば、HepG2細胞）のいずれかであり得る。あるいは、宿主細胞は、組織、器官、または生物におけるインサイチュまたは

10

20

30

40

50

インビボの細胞であり得る。さらに、宿主細胞は、例えば、哺乳動物対象（例えば、遺伝子治療を必要とするヒト患者）の標的細胞であり得る。

【0067】

本明細書に記載される場合、「誘導性プロモーター」は、誘導因子もしくは誘導剤の存在下、それによって影響される場合、またはそれによって接触される場合に、転写活性を開始または強化することによって特徴付けられるものを指すことを意味する。本明細書で使用される場合、「誘導因子」または「誘導剤」は、内因性であり得るか、または誘導性プロモーターからの転写活性を誘導することにおいて活性であるような方式で投与される、通常は外因性の化合物またはタンパク質であり得る。いくつかの実施形態では、誘導因子または誘導剤、すなわち、化学物質、化合物、またはタンパク質は、それ自体が核酸配列の転写または発現の結果であり得（すなわち、誘導因子は、別の構成成分またはモジュールによって発現される誘導因子タンパク質であり得る）、それ自体が誘導性プロモーターの制御下であり得る。いくつかの実施形態では、誘導性プロモーターは、リプレッサーなどのある特定の薬剤の不在下で誘導される。誘導性プロモーターの例としては、テトラサイクリン、メタロチオニン、エクジソン、哺乳動物ウイルス（例えば、アデノウイルス後期プロモーター、およびマウス乳腺腫瘍ウイルス長末端反復（MMTV-LTR））、ならびに他のステロイド応答性プロモーター、ラパマイシン応答性プロモーターなどが挙げられるが、これらに限定されない。

10

【0068】

本明細書で使用される場合、「インビトロ」という用語は、細胞抽出物などの無傷膜を有する細胞の存在を必要としないアッセイおよび方法を指すことを意味し、非細胞系、例えば細胞抽出物などの細胞または細胞系を含まない媒質にプログラム可能な合成生物的回路を導入することを指し得る。

20

【0069】

本明細書で使用される場合、「インビボ」という用語は、多細胞動物などの生物中または生物内で起こるアッセイまたはプロセスを指すことを意味する。本明細書に記載される態様のうちのいくつかでは、方法または使用は、細菌などの単細胞生物が使用されるときに「インビボで」起こると言われ得る。「エクスピボ」という用語は、多細胞動物または植物、例えば、とりわけ外植片、培養細胞（一次細胞および細胞株を含む）、形質転換細胞株、および抽出組織または細胞（血液細胞を含む）の体外に無傷膜を有する生細胞を使用して実施される方法および使用を指す。

30

【0070】

本明細書で使用される場合、「脂質」という用語は、脂肪酸のエステルを含むがこれらに限定されない有機化合物群を指すことを意味し、水に不溶であるが、多くの有機溶媒に可溶であることを特徴とする。脂質は通常、少なくとも3つのクラスに分類される。（1）脂肪および油ならびにワックスを含む「単純脂質」、（2）リン脂質および糖脂質を含む「複合脂質」、ならびに（3）ステロイドなどの「誘導脂質」。

【0071】

リン脂質の代表的な例としては、ホスファチジルコリン、ホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジン酸、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン、リゾホスファチジルコリン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ジパルミトイルホスファチジルコリン、ジオレオイルホスファチジルコリン、ジステアロイルホスファチジルコリン、およびジリノレオイルホスファチジルコリンが含まれるが、これらに限定されない。スフィンゴ脂質、スフィンゴ糖脂質ファミリー、ジアシルグリセロール、およびβ-アシルオキシ酸など、リンを欠く他の化合物も両親媒性脂質と呼ばれる群に含まれる。さらに、上記の両親媒性脂質は、トリグリセリドおよびステロールを含む他の脂質と混合することができる。

40

【0072】

一実施形態では、脂質組成物は、1つ以上の三級アミノ基、1つ以上のフェニルエステル結合、およびジスルフィド結合を含む。

50

【0073】

本明細書で使用される場合、「脂質コンジュゲート」という用語は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）の凝集を阻害するコンジュゲートされた脂質を指すことを意味する。そのような脂質コンジュゲートには、例えば、ジアルキルオキシプロピルと共役したPEG（例えば、PEG-DAAコンジュゲート）、ジアシルグリセロールと共役したPEG（例えば、PEG-DAGコンジュゲート）、コレステロールと共役したPEG、ホスファチジルエタノールアミンと共役したPEG、およびセラミドとコンジュゲートしたPEG（例えば、米国特許第5,885,613号を参照されたい）などのPEG-脂質コンジュゲート、カチオン性PEG脂質、ポリオキサゾリン（POZ）-脂質コンジュゲート（例えば、POZ-DAAコンジュゲート、例えば、2010年1月13日に出願された米国仮出願第61/294,828号、および2010年1月14日に出願された米国仮出願第61/295,140号を参照されたい）、ポリアミドオリゴマー（例えば、ATT A-脂質コンジュゲート）ならびにそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。POZ-脂質コンジュゲートの追加例は、PCT公開第2010/006282号に記載されている。PEGまたはPOZは、脂質に直接コンジュゲートすることができるか、リンカー部分を介して脂質に連結することができる。例えば、非エステル含有リンカー部分およびエステル含有リンカー部分を含む、PEGまたはPOZを脂質に共役するのに好適な任意のリンカー部分を使用することができる。ある特定の好ましい実施形態では、アミドまたはカルバメートなどの非エステル含有リンカー部分が使用される。上記の各特許文書の開示内容は、あらゆる目的で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

20

【0074】

本明細書で使用される場合、「脂質で封入する」という用語は、核酸（例えば、c e D N A）などの活性剤または治療剤を、完全封入、部分封入、またはその両方で提供する脂質粒子を指すことを意味する。好ましい実施形態では、核酸は脂質粒子内に完全に封入される（例えば、核酸を含有する脂質粒子を形成するため）。

【0075】

本明細書で使用される場合、「脂質粒子」または「脂質ナノ粒子」という用語は、核酸治療薬などの治療剤を目的の標的部位（例えば、細胞、組織、器官など）に送達するために使用され得る脂質製剤を指すことを意味する。一実施形態では、本発明の脂質粒子は核酸含有脂質粒子であり、これは典型的にはカチオン性脂質、非カチオン性脂質、および任意選択的に粒子の凝集を防止するコンジュゲートされた脂質から形成される。他の好ましい実施形態では、治療用核酸などの治療剤を粒子の脂質部分に封入し、それにより酵素分解から保護することができる。一実施形態では、脂質粒子は、核酸（例えば、c e D N A）と、1つ以上の三級アミノ基、1つ以上のフェニルエステル結合およびジスルフィド結合を含む脂質とを含む。

30

【0076】

本発明の脂質粒子は、典型的には、約20nm～約120nm、約30nm～約150nm、約40nm～約150nm、約50nm～約150nm、約60nm～約130nm、約70nm～約110nm、約70nm～約100nm、約80nm～約100nm、約90nm～約100nm、約70～約90nm、約80nm～約90nm、約70nm～約80nm、または約30nm、約35nm、約40nm、約45nm、約50nm、約55nm、約60nm、約65nm、約70nm、約75nm、約80nm、約85nm、約90nm、約95nm、約100nm、約105nm、約110nm、約115nm、約120nm、約125nm、約130nm、約135nm、約140nm、約145nmまたは約150nmの平均直径を有する。

40

【0077】

本明細書で使用される場合、「カチオン性脂質」という用語は、生理学的pHで正に荷電する任意の脂質を指す。脂質粒子中のカチオン性脂質は、例えば、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLinDMA）、1,2-ジリノレイルオキシ-N,N-ジメチルアミノプロパン（DLenDMA）、1,2-ジ-γ-リノレ

50

ニルオキシ-N, N-ジメチルアミノプロパン (γ -DL enDMA)、2, 2-ジリノレイル-4-(2-ジメチルアミノエチル)-[1, 3]-ジオキソラン (DL in-K-C2-DMA)、2, 2-ジリノレイル-4-ジメチルアミノメチル-[1, 3]-ジオキソラン (DL in-K-DMA)、「SS切断可能脂質」、またはそれらの混合物などの1つ以上のカチオン性脂質を含み得る。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質はまた、イオン化可能な脂質、すなわち、イオン化可能なカチオン性脂質である。

【0078】

本明細書で使用される場合、「アニオン性脂質」という用語は、生理学的 pH で負に荷電する任意の脂質を指す。これらの脂質には、ホスファチジルグリセロール、カルジオリピン、ジアシルホスファチジルセリン、ジアシルホスファチジン酸、N-ドデカノイルホスファチジルエタノールアミン、N-スクシニルホスファチジルエタノールアミン、N-グルタリルホスファチジルエタノールアミン、リジルホスファチジルグリセロール、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール (POPG)、および中性脂質と結合した他のアニオン性修飾基が含まれるが、これらに限定されない。

【0079】

本明細書で使用される場合、「疎水性脂質」という用語は、長鎖飽和および不飽和脂肪族炭化水素基、ならびに1つ以上の芳香族、脂環式、または複素環式基で任意に置換された基を含むがこれらに限定されない無極性基を有する化合物を指す。適切な例には、ジアシルグリセロール、ジアルキルグリセロール、N-N-ジアルキルアミノ、1, 2-ジアシルオキシ-3-アミノプロパン、および1, 2-ジアルキル-3-アミノプロパンが含まれるが、これらに限定されない。

【0080】

本明細書で使用される場合、「イオン化可能な脂質」という用語は、脂質が生理学的 pH (例えば、pH 7.4) でまたは以下で正に帯電し、第2の pH、好ましくは生理的 pH でまたは以上で中性であるように、少なくとも1つのプロトン化可能または脱プロトン化可能基を有する脂質、例えばカチオン性脂質を指すことを意味する。pH の関数としてのプロトンの付加または除去は平衡プロセスであり、荷電または中性脂質への言及は優勢種の性質を指し、すべての脂質が荷電または中性の形態で存在する必要はないことは、当業者によって理解されるであろう。一般に、イオン化可能な脂質は、約4~約7の範囲のプロトン化可能な基の pKa を有する。いくつかの実施形態では、イオン化可能な脂質は、「切断可能脂質」または「SS切断可能脂質」を含み得る。

【0081】

本明細書で使用される場合、「中性脂質」という用語は、選択された pH で非荷電または中性の双性イオン形態のいずれかで存在する多くの脂質種のいずれかを指すことを意味する。生理学的 pH では、そのような脂質には、例えば、ジアシルホスファチジルコリン、ジアシルホスファチジルエタノールアミン、セラミド、スフィンゴミエリン、セファリン、コレステロール、セレブロシド、およびジアシルグリセロールが含まれる。

【0082】

本明細書で使用される場合、「非カチオン性脂質」という用語は、任意の両親媒性脂質、および任意の他の中性脂質またはアニオン性脂質を指すことを意味する。

【0083】

本明細書で使用される場合、「切断可能脂質」または「SS切断可能脂質」という用語は、ジスルフィド結合の切断可能な単位を含む脂質を指す。切断可能脂質には、pH 感受性の三級アミンおよび自己分解性フェニルエステルを含む脂質様物質を含有する切断可能なジスルフィド結合 (「ss」) が含まれ得る。例えば、SS切断可能脂質は、ss-OP 脂質 (COAT SOME (登録商標) SS-OP)、ss-M 脂質 (COAT SOME (登録商標) SS-M)、ss-E 脂質 (COAT SOME (登録商標) SS-E)、ss-EC 脂質 (COAT SOME (登録商標) SS-EC)、ss-LC 脂質 (COAT SOME (登録商標) SS-LC)、ss-OC 脂質 (COAT SOME (登録商標) SS-OC)、および ss-PalmE 脂質 (例えば、式 I~IV 参照)、または Toga

10

20

30

40

50

shi et al., (2018) Journal of Controlled Release「A hepatic pDNA delivery system based on an intracellular environment sensitive vitamin E-scaffold lipid-like material with the aid of an anti-inflammatory drug」279:262-270によって記載された脂質であり得る。切断可能脂質の追加の例は、米国特許第9,708,628号および米国特許第10,385,030号に記載されており、これらの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態では、切断可能脂質は、酸性区画、例えば、膜不安定化のためのエンドソームまたはリソソーム、および細胞質などの還元環境で切断され得るジスルフィド結合に応答する三級アミンを含む。一実施形態では、切断可能脂質は、カチオン性脂質である。一実施形態では、切断可能脂質は、イオン化可能なカチオン性脂質である。切断可能脂質は、本明細書でより詳細に記載されている。

【0084】

本明細書で使用される場合、「有機脂質溶液」という用語は、全体または一部に脂質を有する有機溶媒を含む組成物を指すことを意味する。

【0085】

本明細書で使用される場合、「リポソーム」という用語は、水性外部から分離された内部水性体積を封入する球形構成で組み立てられた脂質分子を指すことを意味する。リポソームは、少なくとも1つの脂質二層を有する小胞である。リポソームは、典型的に、製剤開発の文脈において薬物／治療薬送達のための担体として使用される。それらは、細胞膜と融合し、その脂質構造を再位置付けすることによって作用して、薬物または活性製剤成分を送達する。そのような送達のためのリポソーム組成物は、典型的には、リン脂質、特にホスファチジルコリンを有する化合物で構成されるが、これらの組成物はまた、他の脂質を含んでもよい。

【0086】

本明細書で使用される場合、「局所送達」という用語は、干渉RNA（例えば、siRNA）などの活性剤の、生物内の標的部位への直接の送達を指すことを意味する。例えば、薬剤は、腫瘍などの疾患部位、または炎症部位などの他の標的部位、または肝臓、心臓、脾臓、腎臓などの標的器官への直接注射によって局所的に送達することができる。

【0087】

本明細書で交換可能に使用される「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチドのいずれかの、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。したがって、この用語には、一本鎖、二本鎖、または多重鎖のDNAもしくはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド、またはプリンおよびピリミジン塩基もしくは他の天然、化学的修飾もしくは生化学的修飾、非天然、もしくは誘導体化されたヌクレオチド塩基を含むポリマーが含まれる。「オリゴヌクレオチド」は、一般に、一本鎖または二本鎖DNAの約5～約100ヌクレオチドのポリヌクレオチドを指す。しかしながら、この開示の目的のために、オリゴヌクレオチドの長さには上限はない。オリゴヌクレオチドは、「オリゴマー」または「オリゴ」としても知られており、遺伝子から単離するか、または当該技術分野で既知である方法によって化学的に合成することができる。「ポリヌクレオチド」および「核酸」という用語は、記載されている実施形態に適用可能であるように、一本鎖（センスまたはアンチセンスなど）および二本鎖ポリヌクレオチドを含むと理解されるべきである。DNAは、例えば、アンチセンス分子、プラスミドDNA、DNA-DNA二重鎖、事前に凝縮されたDNA、PCR産物、ベクター（P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体）、発現カセット、キメラ配列、染色体DNA、またはこれらのグループの誘導体および組み合わせの形態であり得る。DNAは、ミニサークル、プラスミド、バクミド、ミニ遺伝子、ミニストリングDNA（直鎖状の共有結合的に閉じたDNAベクター）、閉端直鎖状二本鎖DNA（CELIDまたはceDNA）、doggy bone（商標）DNA、ダンベル型DNA、最小

10

20

30

40

50

限の免疫学的に定義された遺伝子発現（MIDGE）ーベクター、ウイルスベクターまたは非ウイルスベクターの形態であり得る。RNAは、低分子干渉RNA（siRNA）、ダイサー基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、非対称干渉RNA（aiRNA）、マイクロRNA（miRNA）、mRNA、rRNA、tRNA、ウイルスRNA（vRNA）、およびそれらの組み合わせの形態であり得る。核酸としては、既知のヌクレオチド類似体または修飾型骨格残基もしくは連結を含有する核酸が挙げられ、これらは、合成、天然に存在する、および天然に存在しないものであり、参照核酸と同様の結合特性を有する。そのような類似体および／または修飾残基の例としては、ホスホロチオエート、ホスホロジアミデート、モルホリノオリゴマー（モルホリノ）、ホスホルアミデート、メチルホスホネート、キラルメチルホスホネート、2'-O-メチルリボヌクレオチド、ロックド核酸（LNA（商標））、およびペプチド核酸（PNA）が挙げられる。別途限定されない限り、この用語は、参照核酸と同様の結合特性を有する天然ヌクレオチドの既知の類似体を含有する核酸を包含する。別途明記しない限り、特定の核酸配列はまた、その保存的修飾型バリエーション（例えば、縮重コドン置換）、対立遺伝子、オルソログ、SNP、および相補的配列、同様に、明示的に示された配列を暗黙的に包含する。

【0088】

本明細書で使用される場合、「核酸治療」、「治療用核酸」および「TNA」という語句は、交換可能に使用され、疾患または障害を治療するための治療剤の活性成分として核酸を使用する治療の任意のモダリティを指す。本明細書で使用される場合、これらの語句は、RNAベースの治療薬およびDNAベースの治療薬を指す。RNAベースの治療剤の非限定的な例としては、mRNA、アンチセンスRNAおよびオリゴヌクレオチド、リボザイム、アプタマー、干渉RNA（RNAi）、ダイサー基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、非対称干渉RNA（aiRNA）、マイクロRNA（miRNA）が挙げられる。DNAベースの治療剤の非限定的な例としては、ミニサークルDNA、ミニ遺伝子、ウイルスDNA（例えば、レンチウイルスまたはAAVゲノム）または非ウイルス合成DNAベクター、閉端直鎖状二本鎖DNA（ceDNA／CELiD）、プラスミド、バクミド、doggy bone（商標）DNAベクター、最小限の免疫学的に定義された遺伝子発現（MIDGE）ーベクター、非ウイルスミニストリングDNAベクター（直鎖状の共有結合的に閉じたDNAベクター）、またはダンベル型DNA最小ベクター（「ダンベルDNA」）が挙げられる。

【0089】

本明細書で使用される「阻害ポリヌクレオチド」は、第2の（標的）ポリヌクレオチドの発現（転写または翻訳）を低減または防止するDNAまたはRNA分子を指す。阻害ポリヌクレオチドには、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、および外部ガイド配列が含まれる。「阻害ポリヌクレオチド」という用語はさらに、DNAおよびRNA分子、例えばリボザイムをコードするDNA分子などの実際の阻害種をコードするRNAiを含む。

【0090】

本明細書で使用される場合、RNAi分子、例えばsiRNAまたはmiRNAの活性に関する「遺伝子サイレンシング」または「遺伝子サイレンシングされた」とは、細胞における標的遺伝子のmRNAレベルにおいて、miRNAまたはRNA干渉分子が存在しない細胞で見られるmRNAレベルの少なくとも約5%、約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、約100%の低下を指す。好ましい一実施形態では、mRNAレベルは、少なくとも約70%、約80%、約90%、約95%、約99%、約100%低下する。

【0091】

本明細書で使用される場合、「干渉RNA」または「RNAi」または「干渉RNA配列」という用語は、一本鎖RNA（例えば、成熟miRNA、ssRNAiオリゴヌクレオチド、ssDNAiオリゴヌクレオチド）、二本鎖RNA（すなわち、siRNAなどの二本鎖RNA、ダイサー基質dsRNA、shRNA、aiRNA、またはプレmiR

NA)、DNA-RNAハイブリッド(例えば、PCT公開第2004/078941号を参照されたい)、または干渉RNAが標的遺伝子もしくは配列と同じ細胞に存在する場合、(例えば、分解を媒介するか、または干渉RNA配列に相補的なmRNAの翻訳を阻害することによって)標的遺伝子もしくは配列の発現を低減もしくは阻害することができるDNA-DNAハイブリッド(例えば、PCT公開第2004/104199号を参照されたい)を含む。したがって、干渉RNAは、標的mRNA配列に相補的な一本鎖RNA、または2つの相補鎖または単一の自己相補鎖によって形成される二本鎖RNAを指す。干渉RNAは、標的の遺伝子または配列に対して実質的なもしくは完全な同一性を有し得るか、またはミスマッチの領域(すなわち、ミスマッチモチーフ)を含み得る。干渉RNAの配列は、全長の標的遺伝子またはその部分配列に対応し得る。好ましくは、干渉RNA分子は化学的に合成される。上記の各特許文書の開示内容は、あらゆる目的で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。「RNAi」という用語は、遺伝子サイレンシングRNAi分子、および遺伝子の発現を活性化するRNAiエフェクター分子の両方を含み得る。いくつかの実施形態では、阻害または遺伝子サイレンシングの働きをするRNAi剤は、本明細書に開示される方法、キットおよび組成物において、例えば、自然免疫応答を阻害するために有用である。

【0092】

干渉RNAには、「低分子干渉RNA」または「siRNA」、例えば、長さ約15～60、15～50、または15～40(二重鎖)ヌクレオチド、より典型的には長さ約15～30、15～25、または19～25(二重鎖)ヌクレオチドの干渉RNAを含み、好ましくは長さ約20～24、21～22、または21～23(二重鎖)ヌクレオチドである(例えば、二本鎖siRNAの各相補配列は、長さ15～60、15～50、15～40、15～30、15～25、または19～25ヌクレオチドであり、好ましくは長さ約20～24、21～22、または21～23ヌクレオチドであり、二本鎖siRNAは、長さ約15～60、15～50、15～40、15～30、15～25、または19～25塩基対であり、好ましくは長さ約18～22、19～20、または19～21塩基対である)。siRNA二重鎖は、約1～約4ヌクレオチドまたは約2～約3ヌクレオチドの3'オーバーハングおよび5'ホスフェート末端を含み得る。siRNAの例には、2つの別個の鎖分子から組み立てられた二本鎖ポリヌクレオチド分子(一方の鎖はセンス鎖であり、他方は相補的アンチセンス鎖である)、一本鎖分子から組み立てられた二本鎖ポリヌクレオチド分子(センスおよびアンチセンス領域が核酸ベースまたは非核酸ベースのリンカーによって連結される)、自己相補的なセンス領域およびアンチセンス領域を有するヘアピン二次構造を有する二本鎖ポリヌクレオチド分子、ならびに2つ以上のループ構造および自己相補的なセンスおよびアンチセンス領域を有するステムを有する環状一本鎖ポリヌクレオチド分子(環状ポリヌクレオチドはインビボまたはインビトロでプロセッシングされ、活性な二本鎖siRNA分子を生成し得る)が含まれるが、限定されない。本明細書で使用される場合、「siRNA」という用語は、RNA-RNA二重鎖ならびにDNA-RNAハイブリッドを含む(例えば、PCT公開第2004/078941号を参照されたい)。

【0093】

本明細書で使用される「核酸構築物」という用語は、天然に存在する遺伝子から単離されるか、またはそうでなければ天然に存在しなであろう様式で核酸のセグメントを含有するように修飾されるか、または合成のものである、一本鎖または二本鎖の核酸分子を指す。核酸構築物という用語は、核酸構築物が本開示のコード配列の発現に必要な制御配列を含有する場合、「発現カセット」という用語と同義である。「発現カセット」は、プロモーターに操作可能に連結されたDNAコード配列を含む。

【0094】

「ハイブリダイズ可能」または「相補的」もしくは「実質的に相補的」とは、核酸(例えば、RNA)が、非共有結合的に結合する、すなわち、ワトソン・クリック塩基対および/またはG/U塩基対を形成する、温度および溶液イオン強度の適切なインビトロおよ

10

20

30

40

50

び／またはインビボ条件下で配列特異的、逆平行様式で別の核酸に「アニール」または「ハイブリダイズ」する（すなわち、核酸は、相補的核酸に特異的に結合する）のを可能にするヌクレオチドの配列を含むことを意味する。当該技術分野で既知であるように、標準的なワトソン・クリック塩基対合には、チミジン（Ｔ）とのアデニン（Ａ）対合、ウラシル（Ｕ）とのアデニン（Ａ）対合、およびシトシン（Ｃ）とのグアニン（Ｇ）対合が含まれる。加えて、２つのRNA分子（例えば、dsRNA）間のハイブリダイゼーションのために、グアニン（Ｇ）塩基がウラシル（Ｕ）と対合することも、当該技術分野で既知である。例えば、G／U塩基対合は、mRNA中のコドンとのtRNAアンチコドン塩基対合の文脈において、遺伝コードの縮重（すなわち、冗長性）を部分的に担っている。この開示の文脈において、対象のDNA標的化RNA分子のタンパク質結合セグメント（dsRNA二重鎖）のグアニン（Ｇ）は、ウラシル（Ｕ）に相補的であるとみなされ、逆もまた同様である。したがって、対象のDNA標的化RNA分子のタンパク質結合セグメント（dsRNA二重鎖）の所与のヌクレオチド位置でG／U塩基対を作製できる場合、その位置は、非相補的であるとみなされないが、代わりに相補的であるとみなされる。

【0095】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオチド」は、糖デオキシリボース（DNA）またはリボース（RNA）、塩基、およびリン酸基を含む。ヌクレオチドは、リン酸基を介してともに連結している。

【0096】

「操作可能に連結された」とは、そのように記載された構成成分が、それらが意図された様式で機能することを許可する関係にある並列を指すことを意味する。例えば、プロモーターがその転写または発現に影響を及ぼす場合、プロモーターは、コード配列に操作可能に連結されている。プロモーターは、それが調節する核酸配列の発現を駆動する、または転写を駆動すると言うことができる。「操作可能に連結された」、「作動可能に位置付けられた」、「作動可能に連結された」、「制御下」、および「転写制御下」という語句は、プロモーターが、核酸配列に関して正しい機能的な位置および／または配向にあり、その配列の転写開始および／または発現を制御するように調節することを示す。本明細書で使用される場合、「逆位プロモーター」は、核酸配列が逆配向にあるプロモーターを指し、それによりコード鎖であったものは、今は非コード鎖であり、逆も同様である。逆位プロモーター配列を様々な実施形態で使用して、スイッチの状態を調節する。加えて、様々な実施形態では、プロモーターをエンハンサーと併せて使用することができる。

【0097】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」という用語は、本明細書では交換可能に使用され、コードおよび非コードアミノ酸、化学的または生化学的に修飾または誘導体化されたアミノ酸、および修飾されたペプチド骨格を有するポリペプチドを含み得る、任意の長さのアミノ酸のポリマー形態を指す。

【0098】

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という用語は、リン酸緩衝生理食塩水、水、油／水または水／油などのエマルジョン、および様々なタイプの湿潤剤などの標準的な薬学的担体のいずれかを含む。この用語はまた、ヒトを含む動物での使用について、米国連邦政府の規制当局によって承認された、または米国薬局方に列挙されている薬剤、ならびに対象に重大な刺激を引き起こさず、投与された化合物の生物活性および特性を損なわない担体または希釈剤を包含する。

【0099】

本明細書で使用される場合、「プロモーター」という用語は、タンパク質またはRNAをコードする異種標的遺伝子であり得る、核酸配列の転写を駆動することによって、別の核酸配列の発現を調節する任意の核酸配列を指すことを意味する。プロモーターは、構成的、誘導性、抑制性、組織特異性、またはそれらの任意の組み合わせであり得る。プロモーターは、核酸配列の残りの転写の開始および速度が制御される、核酸配列の制御領域である。プロモーターはまた、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子などの調節タンパク

10

20

30

40

50

質および分子が結合し得る、遺伝子エレメントを含有し得る。プロモーター配列内では、転写開始部位、ならびにRNAポリメラーゼの結合に関与するタンパク質結合ドメインが見出されるであろう。真核生物プロモーターは、必ずしもそうではないが、多くの場合、「TATA」ボックスおよび「CAT」ボックスを含有する。誘導性プロモーターを含む様々なプロモーターを使用して、本明細書に開示される合成AAVベクター中の導入遺伝子の発現を駆動することができる。プロモーター配列は、その3'末端で転写開始部位によって結合され、バックグラウンドより上で検出可能なレベルで転写を開始するのに必要な最小数の塩基またはエレメントを含むように上流（5'配向）に伸びる。

【0100】

プロモーターは、所与の遺伝子または配列のコードセグメントおよび／またはエクソンの上流に位置する5'非コード配列を単離することによって取得され得る、遺伝子または配列と天然に関連するものであり得る。そのようなプロモーターは、「内因性」と呼ばれ得る。同様に、いくつかの実施形態では、エンハンサーは、その配列の下流または上流のいずれかに位置する、核酸配列と天然に関連するものであり得る。いくつかの実施形態では、コード核酸セグメントは、「組換えプロモーター」または「異種プロモーター」の制御下で位置付けられ、これらの両方は、その自然環境において操作可能に連結されたコードされた核酸配列と通常は関連しないプロモーターを指す。同様に、「組換えまたは異種エンハンサー」は、その自然環境において所与の核酸配列と通常は関連しないエンハンサーを指す。そのようなプロモーターまたはエンハンサーは、他の遺伝子のプロモーターまたはエンハンサー、任意の他の原核、ウイルス性、または真核細胞から単離されたプロモーターまたはエンハンサー、および「天然に存在」しない合成プロモーターまたはエンハンサーを含み得、すなわち、異なる転写調節領域の異なるエレメント、および／または当該技術分野において既知である遺伝子操作の方法を通じて発現を変更する変異を含み得る。プロモーターおよびエンハンサーの核酸配列を合成的に産生することに加えて、プロモーター配列は、本明細書に開示される合成生物的回路およびモジュールに関して、PCRを含む組換えクローニングおよび／または核酸増幅技術を使用して産生され得る（例えば、米国特許第4,683,202号、米国特許第5,928,906号を参照されたく、各々は参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）。さらに、ミトコンドリア、クロロプラストなどの非核性細胞小器官内の配列の転写および／または発現を配向する制御配列が同様に用いられ得ることが企図される。

【0101】

本明細書で使用される場合、「エンハンサー」という用語は、1つ以上のタンパク質（例えば、アクチベータータンパク質または転写因子）に結合して、核酸配列の転写活性化を増加させるシス作用性調節配列（例えば、50～1,500塩基対）を指す。エンハンサーは、それらが調節する遺伝子開始部位の上流または遺伝子開始部位の下流で最大1,000,000塩基対に位置付けられ得る。エンハンサーは、非関連遺伝子のイントロン領域内またはエクソン領域内に位置付けられ得る。

【0102】

本明細書で使用される場合、「Rep結合部位」（「RBS」）および「Rep結合エレメント」（「RBE」）は、交換可能に使用され、Repタンパク質（例えば、AAV Rep 78またはAAV Rep 68）の結合部位を指すことを意味し、Repタンパク質による結合時に、Repタンパク質が、RBSを組み込む配列上でその部位特異的エンドヌクレアーゼ活性を実施することを可能にする。RBS配列およびその逆相補体は、一緒に単一RBSを形成する。RBS配列は、当該技術分野において周知であり、例えば、AAV 2において同定されたRBS配列である5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'（配列番号1）を含む。任意の既知のRBS配列は、他の既知のAAV RBS配列および他の天然に既知のまたは合成RBS配列を含む、本発明の実施形態において使用され得る。理論に束縛されるものではないが、Repタンパク質のヌクレアーゼドメインは、二重鎖ヌクレオチド配列GCTCに結合し、したがって2つの既知のAAV Repタンパク質は、二重鎖オリゴヌクレオチド、5'-(GCGC)(GCTC)(GCTC)(G

C T C) - 3' (配列番号 1) に直接結合し、安定してアセンブリすると考えられる。加えて、可溶性凝集配座異性体 (すなわち、不定数の相互関連 R e p タンパク質) は解離し、R e p 結合部位を含有するオリゴヌクレオチドに結合する。各 R e p タンパク質は、各鎖上の窒素塩基およびホスホジエステル骨格の両方と相互作用する。窒素塩基との相互作用は、配列特異性を提供するが、ホスホジエステル骨格との相互作用は、非配列特異性または低配列特異性であり、タンパク質-DNA複合体を安定させる。

【0103】

本明細書で使用される場合、「組換えベクター」という句は、異種核酸配列を含むベクター、またはインビボで発現することができる「導入遺伝子」を指すことを意味する。本明細書に記載されるベクターは、いくつかの実施形態では、他の好適な組成物および療法と組み合わせることができることを理解されたい。いくつかの実施形態では、ベクターは、エピソードである。好適なエピソードベクターの使用は、対象における目的のヌクレオチドを高コピー数の染色体外DNAに維持し、それによって染色体組み込みの潜在的な影響を排除する手段を提供する。

【0104】

本明細書で使用される場合、「レポーター」という用語は、検出可能な読み出しを提供するために使用可能なタンパク質を指すことを意味する。レポーターは、一般に、蛍光、色、または発光などの測定可能なシグナルを産生する。レポータータンパク質コード配列は、細胞または生物中の存在が容易に観察されるタンパク質をコードする。例えば、蛍光タンパク質は、特定波長の光で励起された場合に細胞を蛍光させ、ルシフェラーゼは、細胞に光を生じる反応を触媒させ、β-ガラクトシダーゼなどの酵素は、基質を着色産物に変換する。実験または診断目的のために有用な例示的なレポーターポリペプチドとしては、β-ラクタマーゼ、β-ガラクトシダーゼ (L a c Z)、アルカリホスファターゼ (A P)、チミジンキナーゼ (T K)、緑色蛍光タンパク質 (G F P)、および他の蛍光タンパク質、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (C A T)、ルシフェラーゼ、ならびに当該技術分野において周知の他のものが挙げられるが、これらに限定されない。

【0105】

本明細書で使用される場合、「エフェクタータンパク質」という用語は、例えば、レポーターポリペプチドとして、あるいはより適切には、細胞を殺傷するポリペプチド、例えば毒素、または選択された薬剤もしくはその欠失で細胞を殺傷しやすくする薬剤として、検出可能な読み出しを提供するポリペプチドを指す。エフェクタータンパク質は、宿主細胞のDNAおよび/またはRNAを直接標的または損傷する任意のタンパク質またはペプチドを含む。例えば、エフェクタータンパク質としては、宿主細胞DNA配列を標的とする制限エンドヌクレアーゼ (ゲノム因子であるか染色体外因子であるかにかかわらず)、細胞生存に必要なポリペプチドを標的とするプロテアーゼ、DNAギラーゼ阻害剤、およびリボヌクレアーゼ型毒素が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される合成生物的回路によって制御されるエフェクタータンパク質の発現は、別の合成生物的回路における因子として関与し得、それによって生物的回路系の応答性の範囲および複雑性を拡張する。

【0106】

転写調節因子は、目的の遺伝子の転写を活性化または抑制する、転写アクチベーターおよびリプレッサーを指す。プロモーターは、特定の遺伝子の転写を開始する核酸の領域である。転写アクチベーターは、典型的に、転写プロモーターの近くに結合し、RNAポリメラーゼを動員して転写を直接開始する。リプレッサーは、転写プロモーターに結合し、RNAポリメラーゼによる転写開始を立体的に妨害する。他の転写調節因子は、それらが結合する場所、ならびに細胞条件および環境条件に応じて、アクチベーターまたはリプレッサーのいずれかとして役立ち得る。転写調節因子クラスの非限定例としては、ホメオドメインタンパク質、亜鉛フィンガータンパク質、翼状らせん (フォークヘッド) タンパク質、およびロイシンジッパータンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。

【0107】

本明細書で使用される場合、「リプレッサータンパク質」または「誘導因子タンパク質」は、調節配列エレメントに結合するタンパク質であり、調節配列エレメントに作動可能に連結した配列の転写をそれぞれ抑制または活性化する。本明細書に記載される好ましいリプレッサーおよび誘導因子タンパク質は、少なくとも1つの入力剤または環境入力の存在または不在に敏感である。本明細書に記載される好ましいタンパク質は、例えば、分離可能なDNA結合および入力剤結合、または応答性エレメントもしくはドメインを含む形態のモジュールである。

【0108】

本明細書で使用される場合、「入力剤反応性ドメイン」は、条件または入力剤に結合するか、またはそうでなければ連結DNA結合融合ドメインをその条件もしくは入力の存在に対して反応性にするように、条件または入力剤に反応する転写因子のドメインである。一実施形態では、条件または入力の存在は、入力剤反応性ドメインまたはそれが融合するタンパク質の立体構造変化をもたらし、それが転写因子の転写調節活性を修飾する。

【0109】

本明細書で使用される場合、「センス」および「アンチセンス」という用語は、ポリヌクレオチド上の構造エレメントの配向を指すことを意味する。エレメントのセンスバージョンおよびアンチセンスバージョンは、互いの逆相補体である。

【0110】

本明細書で使用される場合、「配列同一性」という用語は、2つのヌクレオチド配列間の関連性を指すことを意味する。本開示の目的のために、2つのデオキシリボヌクレオチド配列間の配列同一性の程度は、EMBOSSパッケージのNeedleプログラム(EMBOSS: The European Molecular Biology Open Software Suite, Rice et al., 2000, 上記)、好ましくはバージョン3.0.0以降において実装されるように、Needleman-Wunschアルゴリズム(Needleman and Wunsch, 1970, 上記)を使用して決定される。使用される任意のパラメータは、ギャップオープンペナルティ10、ギャップ拡張ペナルティ0.5、およびEDNAFULL(NCBI NUC4.4のEMBOSSバージョン)置換マトリックスである。「最長同一性」とラベル付けされたNeedleの出力(-nobriefオプションを使用して取得される)は、同一性パーセントとして使用され、次のように計算される、(同一のデオキシリボヌクレオチド×100) / アラインメントの長さ-アラインメントにおけるギャップの総数)。アラインメントの長さは、好ましくは少なくとも10ヌクレオチド、好ましくは少なくとも25ヌクレオチド、より好ましくは少なくとも50ヌクレオチド、最も好ましくは少なくとも100ヌクレオチドである。

【0111】

本明細書で使用される場合、「スパーサー領域」という用語は、ベクターまたはゲノム内の機能的エレメントを分離する介在配列を指すことを意味する。いくつかの実施形態では、AAVスパーサー領域は、最適機能性のための所望の処理で2つの機能的エレメントを保持する。いくつかの実施形態では、スパーサー領域は、ベクターまたはゲノムの遺伝的安定性を提供するか、または増大させる。いくつかの実施形態では、スパーサー領域は、クローニング部位および塩基対の設計番号のギャップに便利な位置を提供することによって、ゲノムの容易な遺伝子操作を促進する。例えば、ある特定の態様では、いくつかの制限エンドヌクレアーゼ部位を含むオリゴヌクレオチド「ポリリンカー」もしくは「ポリクローニング部位」、または既知のタンパク質(例えば、転写因子)結合部位を有しないように設計された非オープンリーディングフレーム配列をベクターまたはゲノム中に位置付けて、シス作用性因子を分離することができ、例えば、6mer、12mer、18mer、24mer、48mer、86mer、176merなどを挿入する。

【0112】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、本発明による治療用核酸での予防的治療を含む治療が提供される、ヒトまたは動物を指すことを意味する。通常、動物は、

10

20

30

40

50

限定されないが、霊長類、齧歯類、飼育動物、または狩猟動物などの脊椎動物である。霊長類としては、チンパンジー、カニクイザル、クモザル、およびマカク、例えば、アカゲザルが挙げられるが、これらに限定されない。齧歯類としては、マウス、ラット、ウッドチャック、フェレット、ウサギ、およびハムスターが挙げられる。飼育動物および狩猟動物としては、ウシ、ウマ、ブタ、シカ、バイソン、バッファロー、ネコ種、例えば、飼いネコ、イヌ種、例えば、イヌ、キツネ、オオカミ、トリ種、例えば、ニワトリ、エミュー、ダチョウ、および魚、例えば、トラウト、ナマズ、およびサケが挙げられるが、これらに限定されない。本明細書に記載される態様のある特定の実施形態では、対象は、哺乳動物、例えば、霊長類またはヒトである。対象は、男性または女性であり得る。追加的に、対象は、幼児または子供であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、新生児または胎児対象であり得、例えば、対象は、子宮内に存在する。好ましくは、対象は、哺乳動物である。哺乳動物は、ヒト、非ヒト霊長類、マウス、ラット、イヌ、ネコ、ウマ、またはウシであり得るが、これらの例に限定されない。ヒト以外の哺乳動物は、疾患および障害の動物モデルを代表する対象として有利に使用され得る。加えて、本明細書に記載される方法および組成物は、飼育動物および／またはペットに使用され得る。ヒト対象は、任意の年齢、性別、人種、または民族グループ、例えば、コーカサス人（白人）、アジア人、アフリカ人、黒人、アフリカ系アメリカ人、アフリカ系ヨーロッパ人、ラテンアメリカ系、中東系などであり得る。いくつかの実施形態では、対象は、臨床設定において患者または他の対象であり得る。いくつかの実施形態では、対象は、既に治療を受けている。いくつかの実施形態では、対象は、胚、胎児、新生児、幼児、子供、青年、または成人である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒト胎児、ヒト新生児、ヒト幼児、ヒト子供、ヒト青年、またはヒト成人である。いくつかの実施形態では、対象は、動物胚、または非ヒト胚もしくは非ヒト霊長類胚である。いくつかの実施形態では、対象は、ヒト胚である。

【0113】

本明細書で使用される場合、「必要とする対象」という句は、句の文脈および使用法が別段の指示をしない限り、(i) 記載された発明に従って c e D N A 脂質粒子（または c e D N A 脂質粒子を含む薬学的組成物）を投与される予定であり、(i i) 記載された本発明に従って c e D N A 脂質粒子（または c e D N A 脂質粒子を含む薬学的組成物）を受けているか、または (i i i) 記載された発明に従って c e D N A 脂質粒子（または c e D N A 脂質粒子を含む薬学的組成物）を受けた、対象を指す。

【0114】

本明細書で使用される場合、「抑制する」、「減少する」、「妨害する」、「阻害する」および／または「低減する」という用語（ならびに同様の用語）は、一般に、天然、予想もしくは平均に対して、または対照条件に対して、直接的または間接的に、濃度、レベル、機能、活性、または挙動を低減する行為を指す。

【0115】

本明細書で使用される場合、「合成 A A V ベクター」および「A A V ベクターの合成産生」という用語は、完全に無細胞環境での A A V ベクターおよびその合成産生方法を指すことを意味する。

【0116】

本明細書で使用される場合、「全身送達」という用語は、生物内での干渉 R N A（例えば、s i R N A）などの活性剤の広範な生体内分布をもたらす脂質粒子の送達を指すことを意味する。投与技法によっては、特定の薬剤の全身送達にいたることもあれば、そうでないものもある。全身送達とは、有用な量、好ましくは治療量の薬剤が身体のほとんどの部分にさらされることを意味する。広範な生体内分布を得るには、一般に、薬剤が、投与部位より遠位の疾患部位に到達する前に（初回通過器官（肝臓、肺など）によって、または急速な非特異的細胞結合によって）急速に分解または排出されないような血液寿命が必要である。脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）の全身送達は、例えば静脈内、皮下、および腹腔内を含む、当技術分野で既知の任意の手段によることができる。好ましい実施形態では、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）の全身送達は、静脈内送達による。

【0117】

本明細書で使用される場合、「末端分解部位」および「t r s」という用語は、本明細書で交換可能に使用され、R e p が、細胞DNAポリメラーゼ、例えばDNA p o l デルタまたはDNA p o l イプシロンを介してDNA伸長の基質として役立つ3'-OHを生成する5'チミジンとのチロシン-ホスホジエステル結合を形成する領域を指すことを意味する。代替的に、R e p-チミジン複合体は、配位ライゲーション反応に関与し得る。いくつかの実施形態では、T R Sは、最小限で非塩基対チミジンを包含する。いくつかの実施形態では、T R Sのニッキング効率は、R B Sからの同じ分子内のその距離によって少なくとも部分的に制御され得る。受容体基質が相補的I T Rである場合、得られる産物は、分子間二重鎖である。T R S配列は、当該技術分野において既知であり、例えば、A A V 2において同定されたヘキサヌクレオチド配列である5'-G G T T G A-3'を含む。任意の既知のT R S配列は、他の既知のA A V T R S配列および他の天然に既知のまたはA G T T、G G T T G G、A G T T G G、A G T T G Aなどの合成T R S配列、ならびにR R T T R Rなどの他のモチーフを含む、本発明の実施形態において使用され得る。

【0118】

本明細書で使用される場合、活性剤（例えば、本明細書に記載されるc e DNA脂質粒子）の「治療量」、「治療有効量」、「有効量」、または「薬学的有効量」という用語は交換可能に使用され、治療の意図された利益を提供するのに十分な量を指す。しかしながら、投与量レベルは、傷害の種類、年齢、体重、性別、患者の病状、病状の重症度、投与経路、用いられる特定の活性剤を含む、多様な因子に基づく。したがって、投与レジメンは、大きく異なる可能性があるが、標準的な方法を使用して医師によって常套的に決定され得る。追加的に、「治療量」、「治療有効量」および「薬学的有効量」という用語は、記載された本発明の組成物の予防的（p r o p h y l a c t i c）または予防的（p r e v e n t a t i v e）量を含む。記載された発明の予防的（p r o p h y l a c t i c）または予防的（p r e v e n t a t i v e）用途において、薬学的組成物または薬剤は、疾患、障害または状態の生化学的、組織学のおよび／または行動症状、その合併症、ならびに疾患、障害または状態の発症中に現れる中間の病理学的表現型を含む、疾患、障害または状態に罹患しやすい患者、またはそうでなければそのリスクがある患者に、リスクを排除もしくは低減するか、重症度を減少させるか、または疾患、障害もしくは状態の発症を遅らせるのに十分な量で投与される。いくつかの医学的判断によれば、最大用量、すなわち最高の安全用量を使用することが一般に好ましい。「用量」および「投与量」という用語は、本明細書では交換可能に使用される。

【0119】

本明細書で使用される場合、「治療効果」という用語は、治療の結果を指し、その結果は、望ましくかつ有益であると判断される。治療効果としては、直接的または間接的に、疾患症状の阻止、低減、または排除を挙げることができる。治療効果としてはまた、直接的または間接的に、疾患症状の進行の阻止、低減、または排除を挙げることができる。

【0120】

本明細書に記載される任意の治療剤について、治療有効量は、予備的なインビトロ研究および／または動物モデルから最初に決定することができる。治療有効用量はまた、ヒトのデータから決定することができる。適用される用量は、投与される化合物の相対的な生物学的利用能および効力に基づいて調整することができる。上記の方法および他の周知の方法に基づいて最大の効力を達成するように用量を調整することは、当業者の能力の範囲内である。参照により本明細書に組み込まれる、Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th Edition, McGraw-Hill (New York) (2001)の第1章に見出され得る治療有効性を決定するための一般原則を以下に要約する。

【0121】

薬物動態学原理は、許容できない副作用を最小限に抑えながら、望ましい程度の治療効果を得るために投与レジメンを変更するための基礎を提供する。薬物の血漿濃度を測定

10

20

30

40

50

でき、治療濃度域に関連している状況では、投与量の変更に関する追加のガイダンスを入手することができる。

【0122】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療すること」、および／または「治療」という用語は、状態の進行を抑制する、実質的に阻害する、遅らせる、もしくは逆転させる、状態の臨床症状を実質的に改善する、または臨床症状の出現を実質的に防ぐ、有益なもしくは望ましい臨床結果を得ることを含む。治療することは、(a) 障害の重症度を低減すること、(b) 治療されている障害に特徴的な症状の発症を限定すること、(c) 治療されている障害に特徴的な症状の悪化を限定すること、(d) 以前に障害を有していた患者における障害の再発を限定すること、および(e) 以前は障害に関して無症候性であった患者の症状の再発を限定することのうちの1つ以上を達成することをさらに指す。

10

【0123】

薬理学的および／または生理学的効果などの有益なまたは所望の臨床結果は、疾患、障害または状態の素因を有する可能性があるが、疾患の症状をまだ経験していないか、もしくは呈していない対象において疾患、障害または状態が発生するのを防ぐこと（予防的治療）、疾患、障害または状態の症状の緩和、疾患、障害または状態の程度の減少、疾患、障害または状態の安定化（すなわち、悪化させない）、疾患、障害または状態の蔓延を防ぐこと、疾患、障害または状態の進行を遅らせるまたは遅くすること、疾患、障害または状態の改善または軽減、およびそれらの組み合わせ、同様に治療を受けていない場合に予想される生存と比較して生存を延長することを含むが、これらに限定されない。

20

【0124】

「ベクター」または「発現ベクター」という用語は、別のDNAセグメント、すなわち「インサート」「導入遺伝子」または「発現カセット」が、細胞において結合されたセグメント（「発現カセット」）の発現または複製をもたらすために、結合され得るプラスミド、バクミド、ファージ、ウイルス、ビリオン、またはコスミドなどのレプリコンを指すことを意味する。ベクターは、宿主細胞への送達のために、または異なる宿主細胞間の移動のために設計された核酸構築物であり得る。本明細書で使用される場合、ベクターは、最終的な形態でウイルス起源、または非ウイルス起源であり得る。しかしながら、本開示の目的のために、「ベクター」は、一般に、合成AAVベクターまたはニックの入ったceDNAベクターを指す。したがって、「ベクター」という用語は、適切な制御エレメントと関連する場合に複製することができ、遺伝子配列を細胞に移すことができる任意の遺伝的エレメントを包含する。いくつかの実施形態では、ベクターは、組換えベクターまたは発現ベクターであり得る。

30

【0125】

本明細書に開示される本発明の代替的なエレメントまたは実施形態の群化は、限定として解釈されるべきではない。各群のメンバーは、個別に、または群の他のメンバーまたは本明細書で見られる他のエレメントとの任意の組み合わせで参照および主張することができる。群の1つ以上のメンバーは、利便性および／または特許性の理由から、群に含める、または群から削除することができる。そのような任意の包含または削除が発生した場合、本明細書では、明細書が修飾された群を含むとみなされ、したがって添付の特許請求の範囲で使用されているすべてのマーカッシュ群の記述を満たす。

40

【0126】

態様のうちのいくつかの実施形態では、本明細書に記載される開示は、人間のクローン化プロセス、人間の生殖細胞系列の遺伝子同一性を修正するプロセス、産業もしくは商業目的でのヒト胚の使用、または人もしくは動物にいかなる実質的な医学的利益ももたらすことなく苦しみを引き起こす可能性が高い動物、およびそのようなプロセスから生じる動物の遺伝子同一性を修飾するためのプロセスに関係しない。

【0127】

本明細書では、本発明の様々な態様の説明内で他の用語が定義されている。

【0128】

50

文献参照、発行済み特許、公開済みの特許出願、および係属中の特許出願を含む、本出願を通して引用されるすべての特許および他の出版物は、例えば、本明細書に記載される技術に関連して使用され得るそのような刊行物に記載される方法論を説明および開示する目的で、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。これらの出版物は、本出願の出願日より前のそれらの開示のためにのみ提供されている。この点に関するいかなるものも、発明者が先行発明のおかげで、またはいかなる他の理由のためにもそのような開示に先行する権利がないことを認めるものとして解釈されるべきではない。日付に関するすべての記述またはこれらの文書の内容に関する表現は、出願人に利用可能である情報に基づいており、これらの文書の日付または内容の正確さに関するいかなる承認も構成するものではない。

10

【0129】

本開示の実施形態の説明は、網羅的であること、または本開示を開示された正確な形態に限定することを意図したものではない。本開示の特定の実施形態および実施例が、例示の目的で本明細書で説明されているが、当業者が認識するように、本開示の範囲内で様々な同等の修正が可能である。例えば、方法のステップまたは機能は、所与の順序で提示されるが、代替的な実施形態は、異なる順序で機能を実施してもよく、または機能は実質的に同時に実施されてもよい。本明細書で提供される開示の教示は、必要に応じて他の手順または方法に適用することができる。本明細書に記載される様々な実施形態は、さらなる実施形態を提供するために組み合わせることができる。本開示の態様は、必要に応じて、上記の参照文献および出願の組成物、機能、および概念を用いて本開示のさらなる実施形態を提供するように修正することができる。さらに、生物学的機能の同等性の考慮により、種類または量の生物学的または化学的作用に影響を与えることなく、タンパク質構造にいくつかの変更を加えることができる。詳細な説明に照らして、これらの変更および他の変更を本開示に加えることができる。そのような修正はすべて、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図されている。

20

【0130】

前述の実施形態のうちのいずれかの特定のエレメントは、他の実施形態のエレメントと組み合わせるか、または置き換えることができる。さらに、本開示のある特定の実施形態に関連する利点が、これらの実施形態の文脈で説明されたが、他の実施形態もそのような利点を示し得、すべての実施形態が本開示の範囲内にあるために必ずしもそのような利点を示す必要はない。

30

【0131】

本明細書に記載される技術は、以下の実施例によってさらに説明されており、決してこれらをさらに限定するものと解釈されるべきではない。本発明は、本明細書に記載される特定の方法論、プロトコル、および試薬などにいかなる様式でも限定されず、そのようなものとして変化し得ることを理解されたい。本明細書で使用される用語法は、特定の実施形態のみを説明する目的のためであり、単に特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲を限定することを意図されない。

【0132】

II. 切断可能脂質

40

本明細書に提供されるのは、切断可能脂質、および目的の標的部位（例えば、細胞、組織、器官など）にカプシド不含非ウイルス性DNAベクターを送達するために使用され得るカプシド不含非ウイルス性ベクター（例えば、cDNA）を含む薬学的組成物である。本明細書で使用される場合、「切断可能脂質」という用語は、ジスルフィド結合（「SS」）切断可能な単位を含むカチオン性脂質を指す。一実施形態では、SS切断可能脂質は、酸性区画、膜不安定化のための（例えば、エンドソームまたはリソソーム）、および還元環境（例えば、細胞質）で切断され得るジスルフィド結合に応答する三級アミンを含む。SS切断可能脂質としては、ss-OP脂質、ss-Palm脂質、ss-M脂質、ss-E脂質、ss-EC脂質、ss-LC脂質、ss-OC脂質などのSS切断可能およびpH活性化脂質様物質が挙げられ得る。本明細書に示されるように、切断可能脂質を含

50

む c e D N A 脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、例えば、肝細胞を含む標的細胞への c e D N A のより効率的な送達を提供する。本開示によって報告されるように、c e D N A および切断可能脂質を含む c e D N A 粒子は、M C 3 などの他の脂質と比較して、同等のルシフェラーゼ発現を示す肝臓での c e D N A コピーが少なくなった。実際、c e D N A と切断可能脂質との相乗効果が観察され、他の脂質、例えば M C 3 と比較して、c e D N A 発現を最大 4, 0 0 0 倍増加させながら、食作用効果を最小限にする（例えば、図 1 4 ～ 1 7 を参照）。本開示によっても報告されるように、m R N A および切断可能脂質を含む脂質製剤は、ラットにおける網膜下注射後の最大 3 日間、ビヒクル対照と比較して、導入遺伝子発現の増加をもたらした（図 2 4 および図 2 5）。したがって、本明細書に記載の脂質粒子（例えば、c e D N A 脂質粒子または m R N A 脂質粒子）を有利に使用して、食作用が最小限またはまったくない他の従来の脂質と比較して、標的細胞／組織への核酸（例えば、c e D N A または m R N A）の送達を増加させることができる。したがって、本明細書に記載の脂質粒子（例えば、c e D N A 脂質粒子、または m R N A 脂質粒子）は、当該技術分野において既知の従来の脂質ナノ粒子と比較して、増強された核酸送達を提供した。メカニズムはまだ決定されておらず、理論に束縛されるものではないが、切断可能脂質を含む脂質粒子（例えば、c e D N A 脂質粒子または m R N A 脂質粒子）は、肝細胞への送達を改善し、食作用を回避すると考えられる。本明細書に記載の切断可能脂質を含む脂質粒子を含有する c e D N A の別の利点は、それらが、インビボで、他の脂質ナノ粒子、例えば、M C 3 と比較して優れた忍容性を示すことである。

【0133】

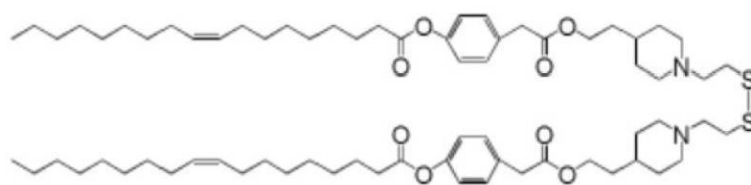
一実施形態では、切断可能脂質は、3つの成分、すなわち、アミン先端基、リンカー基、および疎水性テールを含み得る。一実施形態では、切断可能脂質は、1つ以上のフェニルエステル結合、1つ以上の三級アミノ基、およびジスルフィド結合を含む。三級アミノ基は p H 応答性を提供し、エンドソームの脱出を誘導し、フェニルエステル結合は、構造の分解性（自己分解性）を高め、ジスルフィド結合は、還元環境で切断する。

【0134】

一実施形態では、切断可能脂質は、s s -O P 脂質である。一実施形態では、s s -O P 脂質は、以下の式 I に示される構造を含む。

【化2】

式 I

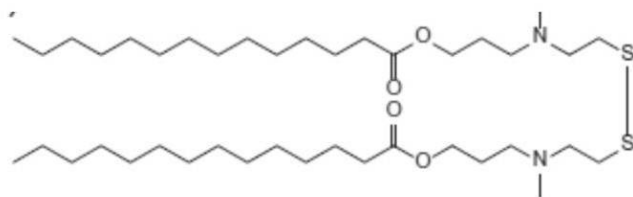


【0135】

一実施形態では、S S 切断可能脂質は、S S 切断可能および p H 活性化脂質様物質（s s P a l m）である。s s P a l m 脂質は、当該技術分野において周知である。例えば、T o g a s h i e t a l. , J o u r n a l o f C o n t r o l l e d R e l e a s e , 2 7 9 (2 0 1 8) 2 6 2 - 2 7 0 を参照し、これらの全内容は参照により本明細書に組み込まれる。一実施形態では、s s P a l m は、式 I I の構造を含む s s P a l m 脂質である。

【化3】

式(II) :

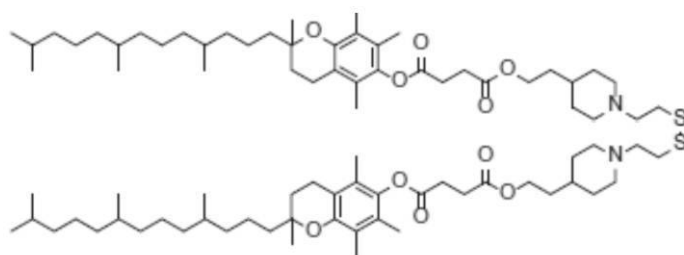


【0136】

一実施形態では、ssPalme脂質は、式IIIの構造を含むssPalme-P4-C2脂質である。

【化4】

式III

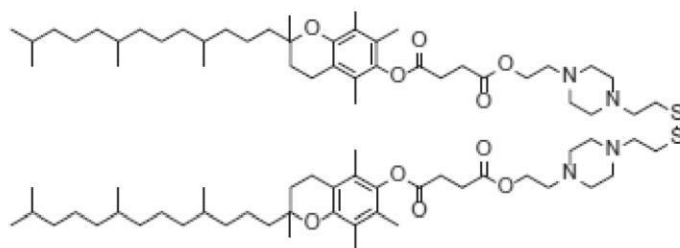


【0137】

一実施形態では、ssPalme脂質は、式IVの構造を含むssPalme-Paz4-C2脂質である。

【化5】

式IV

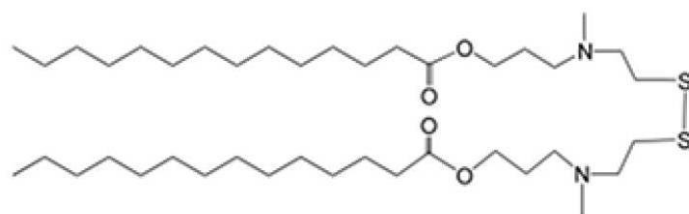


【0138】

一実施形態では、切断可能脂質は、ss-M脂質である。一実施形態では、ss-M脂質は、以下の式Vに示される構造を含む。

【化6】

式V



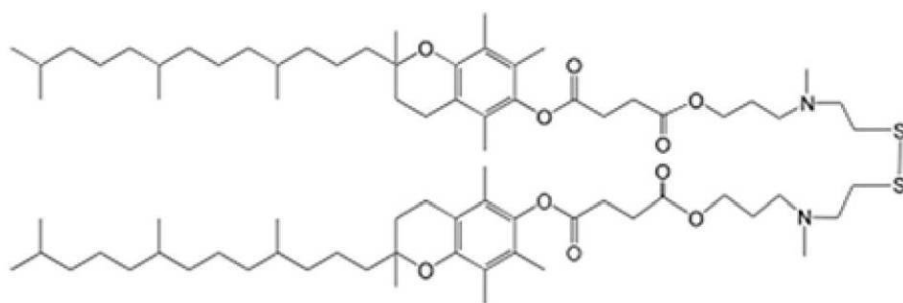
【0139】

一実施形態では、切断可能脂質は、ss-E脂質である。一実施形態では、ss-E脂

質は、以下の式 V I に示される構造を含む。

【化 7】

式 V I



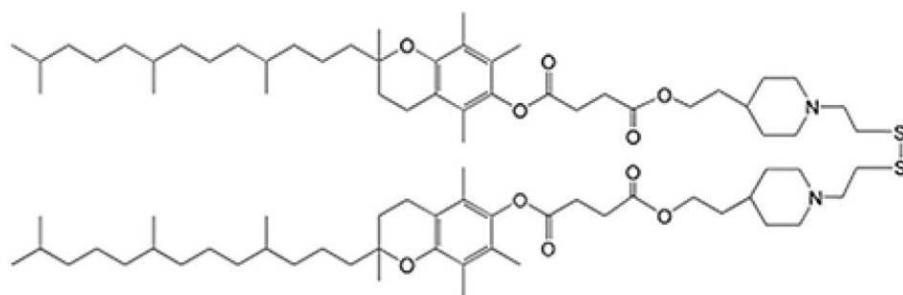
10

【0140】

一実施形態では、切断可能脂質は、ss-EC脂質である。一実施形態では、ss-EC脂質は、以下の式 V I I に示される構造を含む。

【化 8】

式 V I I



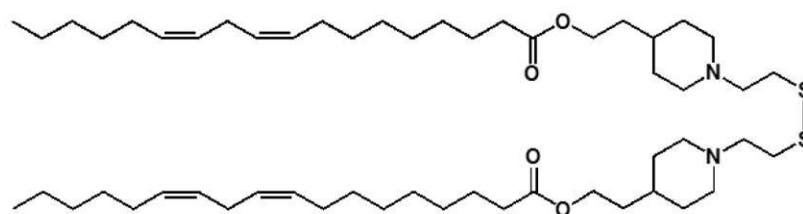
20

【0141】

一実施形態では、切断可能脂質は、ss-LC脂質である。一実施形態では、ss-LC脂質は、以下の式 V I I I に示される構造を含む。

【化 9】

式 V I I I



30

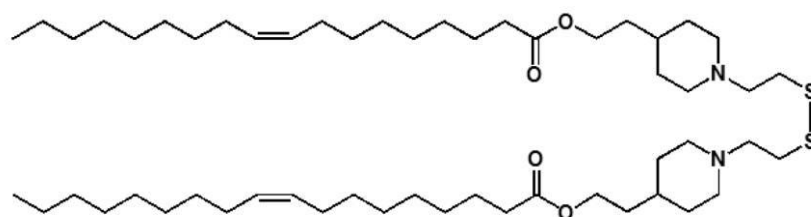
【0142】

一実施形態では、切断可能脂質は、ss-OC脂質である。一実施形態では、ss-OC脂質は、以下の式 I X に示される構造を含む。

40

【化 10】

式 IX



【0143】

一実施形態では、脂質粒子（脂質ナノ粒子）製剤は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、2018年9月7日に出願された国際出願第2018/050042号に開示されるプロセスにより得られたceDNAで作製およびロードされる。これは、脂質をプロトン化し、粒子のceDNA／脂質会合および核形成に好ましいエネルギー論を提供する、低pHでのエタノール脂質と水性ceDNAとの高エネルギー混合によって達成され得る。粒子は、水性希釈および有機溶媒の除去によってさらに安定化され得る。粒子は、所望のレベルに濃縮され得る。一実施形態では、本開示は、実施例6に記載のプロセスによって調製された式Iの脂質を含むceDNA脂質粒子を提供する。

【0144】

一般に、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、約10：1～60：1の全脂質対ceDNA（質量または重量）比で調製される。いくつかの実施形態では、脂質対ceDNA比（質量／質量比、w／w比）は、約1：1～約60：1、約1：1～約55：1、約1：1～約50：1、約1：1～約45：1、約1：1～約40：1、約1：1～約35：1、約1：1～約30：1、約1：1～約25：1、約10：1～約14：1、約3：1～約15：1、約4：1～約10：1、約5：1～約9：1、約6：1～約9：1、約30：1～約60：1の範囲内であり得る。いくつかの実施形態によれば、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、約60：1の全脂質比に対するceDNA（質量または重量）で調製される。いくつかの実施形態によれば、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、約30：1の全脂質比に対するceDNA（質量または重量）で調製される。脂質およびceDNAの量を調整して、所望のN／P比、例えば3、4、5、6、7、8、9、10以上のN／P比を提供し得る。一般に、脂質粒子製剤の全体脂質含有量は、約5mg／mL～約30mg／mLの範囲であり得る。

【0145】

いくつかの実施形態では、脂質ナノ粒子は、ceDNAなどの核酸カーゴを凝縮および／または封入するための薬剤を含む。このような薬剤は、本明細書では、凝縮剤または封入剤とも称される。制限なしに、核酸を凝縮および／または封入するための当該技術分野で既知の任意の化合物は、それが非融合性である限り使用することができる。言い換えれば、薬剤は、ceDNAなどの核酸カーゴを凝縮および／または封入することができるが、融合活性をほとんどまたはまったく有しない。理論に拘束されることを望まないが、凝縮剤は、ceDNAなどの核酸を凝縮／封入しない場合、いくらかの融合活性を有する可能性があるが、当該凝縮剤で形成された脂質ナノ粒子を封入する核酸は、非融合性であり得る。

【0146】

カチオン性脂質は、典型的に、核酸カーゴ、例えばceDNAを低pHで凝縮させるため、および膜会合および膜融合性を駆動するために用いられる。一般に、カチオン性脂質は、正に電荷される、または例えばpH6.5以下の酸性条件下でプロトン化される少なくとも1つのアミノ基を含む脂質である。カチオン性脂質はまた、イオン化可能な脂質、例えば、イオン化可能なカチオン性脂質であり得る。「非融合性カチオン性脂質」とは、ceDNAなどの核酸カーゴを凝縮および／または封入することができるが、融合性活性

10

20

30

40

50

を有するか、またはほとんど有しないカチオン性脂質を意味する。

【0147】

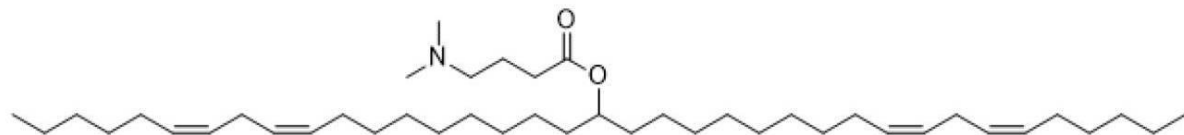
一実施形態では、非カチオン性脂質は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）に存在する全脂質の20～90%（mol）を含み得る。例えば、カチオン性脂質モル含有量は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）に存在する全脂質の20～70%（mol）、30～60%（mol）、40～60%（mol）、40～55%（mol）または45～55%（mol）であり得る。いくつかの実施形態では、カチオン性脂質は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）に存在する全脂質の約50mol%～約90mol%を含む。

【0148】

一実施形態では、SS切断可能脂質は、MC3（6Z，9Z，28Z，31Z）-ヘプタトリアコンター6，9，28，31-テトラエン-19-イル-4-（ジメチルアミノ）ブタノエート（DLin-MC3-DMAまたはMC3）ではない。DLin-MC3-DMAは、Jayaraman et al., Angew. Chem. Int. Ed Engl. (2012), 51(34): 8529-8533に記載され、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。D-Lin-MC3-DMA（MC3）の構造を式Xとして以下に示す。

【化11】

式X



【0149】

一実施形態では、切断可能脂質は、脂質ATX-002ではない。脂質ATX-002は、WO2015/074085（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載されている。一実施形態では、切断可能脂質は、（13Z，16Z）-V，/V-ジメチル-3-ノニルドコサ-13，16-ジエン-1-アミン（化合物32）ではない。化合物32は、WO2012/040184に記載され、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一実施形態では、切断可能脂質は、化合物6または化合物22ではない。化合物6および22は、WO2015/199952に記載され、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0150】

一実施形態では、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、非カチオン性脂質をさらに含むことができる。非カチオン性脂質は、融合性を高め、形成中のLNPの安定性を高めるのに役立つことができる。非イオン性脂質としては、両親媒性脂質、中性脂質、およびアニオン性脂質が挙げられる。したがって、非カチオン性脂質は、中性の非電荷、双性イオン性、またはアニオン性脂質であり得る。非カチオン性脂質は、典型的に、膜融合性を増強するために用いられる。

【0151】

例示的な非カチオン性脂質としては、ジステアロイル-sn-グリセロールホスホエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホスファチジルグリセロール（DOPG）、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール（DPPG）、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン（DOPE）、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン（POPC）、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン（POPE）、ジオレオイル-ホスファチジルエタノールアミン4-（N-マレイミドメチル）-シクロヘキサン-1-カルボキシレート（DOPE-mal）、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（DPPE）、ジミリスチルホスホエタノールアミン（DMPE）、ジステアロイル-ホスファチジル-エタノール

ルアミン (D S P E)、モノメチルホスファチジルエタノールアミン (16-O-モノメチル P E など)、ジメチルホスファチジルエタノールアミン (16-O-ジメチル P E など)、18-1-トランス P E、1-ステアロイル-2-オレオイルホスファチジルエタノールアミン (S O P E)、水素化ダイズホスファチジルコリン (H S P C)、卵ホスファチジルコリン (E P C)、ジオレオイルホスファチジルセリン (D O P S)、スフィンゴミエリン (S M)、ジミリストイルホスファチジルコリン (D M P C)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (D M P G)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (D S P G)、ジェルコイルホスファチジルコリン (D E P C)、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール (P O P G)、ジェライドイルホスファチジルエタノールアミン (D E P E)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (D L P E)、1,2-ジフィタノイル (d i p h y t a n o y l)-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (D P H y P E)、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン (E S M)、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジカシド、セレブロシド、ジセチルホスフェート、リゾホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、またはそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。他のジアシルホスファチジルコリンおよびジアシルホスファチジルエタノールアミンリン脂質もまた使用され得ることを理解されたい。これらの脂質中のアシル基は、好ましくは、C₁₀~C₂₄炭素鎖を有する脂肪酸に由来するアシル基、例えば、ラウロイル、ミリストイル、パルミトイル、ステアロイル、またはオレオイルである。

【0152】

脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) 中での使用に好適な非カチオン性脂質の他の例としては、例えば、ステアリルアミン、ドデシルアミン、ヘキサデシルアミン、パルミチン酸アセチル、リシノール酸グリセロール、ステアリン酸ヘキサデシル、ミリスチン酸イソプロピル、両性アクリル系ポリマー、トリエタノールアミン-硫酸ラウリル、アルキルアールサルフェートポリエチルオキシ化脂肪酸アミド、ジオクタデシルジメチル臭化アンモニウム、セラミド、スフィンゴミエリンなどの非亜リン脂質が挙げられる。

【0153】

一実施形態では、非カチオン性脂質は、リン脂質である。一実施形態では、非カチオン性脂質は、D S P C、D P P C、D M P C、D O P C、P O P C、D O P E、および S M からなる群から選択される。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、D S P C である。他の実施形態では、非カチオン性脂質は、D O P C である。他の実施形態では、非カチオン性脂質は、D O P E である。

【0154】

いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質は、脂質ナノ粒子中に存在する全脂質の 0~20% (m o l) を構成し得る。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質含有量は、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) に存在する全脂質の 0.5~15% (m o l) である。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質含有量は、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) に存在する全脂質の 5~12% (m o l) である。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質含有量は、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) に存在する全脂質の 5~10% (m o l) である。一実施形態では、非カチオン性脂質含有量は、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) に存在する全脂質の約 6% (m o l) である。一実施形態では、非カチオン性脂質含有量は、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) に存在する全脂質の約 7.0% (m o l) である。一実施形態では、非カチオン性脂質含有量は、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) に存在する全脂質の約 7.5% (m o l) である。一実施形態では、非カチオン性脂質含有量は、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) に存在する全脂質の約 8.0% (m o l) である。一実施形態では、非カチオン性脂質含有量は、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) に存在する全脂質の約 9.0% (m o l) である。いくつかの実施形態では、非カチオン性脂質含有量は、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) に存在する全脂質の約 1

0% (mol) である。一実施形態では、非カチオン性脂質含有量は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）に存在する全脂質の約11% (mol) である。

【0155】

例示的な非カチオン性脂質は、PCT公開第2017/099823号および米国特許公開第2018/0028664号に記載されており、これらの両方の内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0156】

カチオン性脂質の非限定的な例としては、SS切断可能およびpH活性化脂質様物質-OP (ss-OP、式I)、SS切断可能およびpH活性化脂質様物質-M (SS-M、式V)、SS切断可能およびpH活性化脂質様物質-E (SS-E、式VII)、SS切断可能およびpH活性化脂質様物質-EC (SS-EC、式VIII)、SS切断可能およびpH活性化脂質様物質-LC (SS-LC、式VIII)、SS切断可能およびpH活性化脂質様物質-OC (SS-OC、式IX)、ポリエチレンジアミン、ポリアミドアミン (PAMAM) スターバーストデンドリマー、リポフェクチン (DOTMAおよびDOPEの組み合わせ)、Lipofectase、LIPOFECTAMINE (商標) (例えば、LIPOFECTAMINE (商標) 2000)、DOPE、Cytofectin (Gilead Sciences、Foster City, Calif.)、およびEfectedins (JBL、San Luis Obispo, Calif.) が挙げられる。例示的なカチオン性リポソームは、N-[L-(2,3-ジオールオキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムクロリド (DOTMA)、N-[L-(2,3-ジオールオキシ)-プロピル]-N,N,N-トリメチルアンモニウムメチルサルフェート (DOTAP)、3b-[N-(N',N'-ジメチルアミノエタン)カルバモイル]コレステロール (DC-Chol)、2,3-ジオレイルオキシ-N[2(スベルミンカルボキサミド)エチル]-N,N-ジメチル-L-プロパンアミニウムトリフルオロアセテート (DOSPA)、1,2-ジミリスチルオキシプロピル-3-ジメチル-L-ヒドロキシエチルアンモニウムブロミド、およびジメチルジオクタデシルアンモニウムブロミド (DDAB) から作製することができる。核酸 (例えば、ceDNAまたはCELID) はまた、例えばポリ(L-リジン) またはアビジンと複合され得、脂質は、この混合物、例えばステリルポリ(L-リジン) に含まれ得るか、または含まれない場合がある。

【0157】

一実施形態では、カチオン性脂質は、式Iのss-OPである。別の実施形態では、カチオン性脂質は、式IIのSS-PAZである。

【0158】

一実施形態では、本明細書に開示されるceDNAベクターは、米国特許第8,158,601号に記載されるカチオン性脂質、または米国特許第8,034,376号に記載される脂質を使用して送達される。

【0159】

一実施形態では、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) は、脂質粒子の膜の統合性および安定性を提供するために、ステロールなどの成分をさらに含むことができる。一実施形態では、脂質粒子に使用することができる例示的なステロールは、コレステロールまたはその誘導体である。コレステロール誘導体の非限定例としては、5 α -コレスタノール、5 β -コプロスタノール、コレステリル-(2'-ヒドロキシ)-エチルエーテル、コレステリル-(4'-ヒドロキシ)-ブチルエーテルおよび6-ケトコレスタノールなどの極性類似体、5 α -コレスタン、コレステノン、5 α -コレスタノン、5 β -コレスタノンおよびデカン酸コレステリルなどの非極性類似体、ならびにそれらの混合物が挙げられる。いくつかの実施形態では、コレステロール誘導体は、コレステリル-(4'-ヒドロキシ)-ブチルエーテルなどの極性類似体である。いくつかの実施形態では、コレステロール誘導体は、ヘミコハク酸コレストリル (CHEMS) である。

【0160】

例示的なコレステロール誘導体は、PCT公開第2009/127060号および米国

10

20

30

40

50

特許公開第2010/0130588号に記載されており、これらの両方の内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【0161】

一実施形態では、ステロールなどの膜統合性を提供する成分は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）に存在する全脂質の0～50%（mol）を含み得る。いくつかの実施形態では、そのような成分は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）の全脂質含有量の20～50%（mol）である。いくつかの実施形態では、そのような成分は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）の全脂質含有量の30～40%（mol）である。いくつかの実施形態では、そのような成分は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）の全脂質含有量の35～45%（mol）である。いくつかの実施形態では、そのような成分は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）の全脂質含有量の38～42%（mol）である。

10

【0162】

一実施形態では、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、ポリエチレングリコール（PEG）またはコンジュゲートされた脂質分子をさらに含み得る。一般に、これらを使用して、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）の凝集を阻害し、かつ／または立体安定化を提供する。例示的なコンジュゲートされた脂質としては、PEG-脂質コンジュゲート、ポリオキサゾリン（POZ）-脂質コンジュゲート、ポリアミド-脂質コンジュゲート（ATA-脂質コンジュゲートなど）、カチオン性-ポリマー脂質（CPL）コンジュゲート、およびそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、コンジュゲートされた脂質分子は、PEG-脂質コンジュゲート、例えば、（メトキシポリエチレングリコール）-コンジュゲートされた脂質である。いくつかの実施形態では、コンジュゲートされた脂質分子は、PEG-脂質コンジュゲート、例えば、PEG₂₀₀₀-DMG（ジミリストイルグリセロール）である。

20

【0163】

例示的なPEG-脂質コンジュゲートとしては、PEG-ジアシルグリセロール（DAG）（1-（モノメトキシ-ポリエチレングリコール）-2,3-ジミリストイルグリセロール（PEG-DMG））、PEG-ジアルキルオキシプロピル（DAA）、PEG-リン脂質、PEG-セラミド（Cer）、PEG化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）、PEGコハク酸ジアシルグリセロール（PEGs-DAG）（4-O-（2',3'-ジ（テトラデカノイルオキシ）プロピル-1-O-（w-メトキシ（ポリエトキシ）エチル）ブタンジオエート（PEG-S-DMG））、PEGジアルコキシプロピルカルバム、N-（カルボニル-メトキシポリエチレングリコール2000）-1,2-ジステアロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミンナトリウム塩、またはそれらの混合物が挙げられるが、これらに限定されない。追加の例示的なPEG-脂質コンジュゲートは、例えば、US5,885,613、US6,287,591、US2003/0077829、US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2010/0130588、US2016/0376224、およびUS2017/0119904に記載されており、それらすべての内容は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。

30

【0164】

一実施形態では、PEG-DAAコンジュゲートは、例えば、PEG-ジラウリルオキシプロピル、PEG-ジミリスチルオキシプロピル、PEG-ジパルミチルオキシプロピル、またはPEG-ジステアリルオキシプロピルであり得る。PEG-脂質は、PEG-DMG、PEG-ジラウリルグリセロール、PEG-ジパルミトイルグリセロール、PEG-ジステリルグリセロール、PEG-ジラウリルグリカミド、PEG-ジミリスチルグリカミド、PEG-ジパルミトイルグリカミド、PEG-ジステリルグリカミド、PEG-コレステロール（1-[8'-（コレステ-5-エン-3[ベータ]-オキシ）カルボキシアミド-3',6'-ジオキサオクタニル]カルバモイル-[オメガ]-メチル-ポリ（エチレングリコール））、PEG-DMB（3,4-ジテトラデコキシルベンジル-[オメガ]-メチル-ポリ（エチレングリコール）エーテル）、および1,2-ジミリストイル

40

50

－sn－グリセロ－3－ホスホエタノールアミン－N－[メトキシ（ポリエチレングリコール）－2000]のうちの1つ以上であり得る。一実施形態では、PEG脂質は、PEG－DMG、1,2－ジミリスチル－sn－グリセロ－3－ホスホエタノールアミン－N－[メトキシ（ポリエチレングリコール）－2000]からなる群から選択することができる。

【0165】

一実施形態では、PEG以外の分子とコンジュゲートされた脂質は、PEG－脂質の代わりに使用することもできる。例えば、ポリオキサゾリン（POZ）－脂質コンジュゲート、ポリアミド－脂質コンジュゲート（ATTA－脂質コンジュゲートなど）、およびカチオン性－ポリマー脂質（CPL）コンジュゲートを、PEG－脂質の代わりに、またはそれに加えて使用することができる。例示的なコンジュゲートされた脂質、すなわち、PEG－脂質、（POZ）－脂質コンジュゲート、ATTA－脂質コンジュゲート、およびカチオン性ポリマー－脂質は、PCT特許出願公開第1996/010392号、同第1998/051278号、同第2002/087541号、同第2005/026372号、同第2008/147438号、同第2009/086558号、同第2012/000104号、同第2017/117528号、同第2017/099823号、同第2015/199952号、同第2017/004143号、同第2015/095346号、同第2012/000104号、同第2012/000104号、および同第2010/006282号、米国特許出願公開第2003/0077829号、同第2005/0175682号、同第2008/0020058号、同第2011/0117125号、同第2013/0303587号、同第2018/0028664号、同第2015/0376115号、同第2016/0376224号、同第2016/0317458号、同第2013/0303587号、同第2013/0303587号、および同第2011/0123453号、ならびに米国特許第5,885,613号、同第6,287,591号、同第6,320,017号、および同第6,586,559号に記載されており、これらの内容はすべて、参照によりそれら全体が本明細書に組み込まれる。

【0166】

いくつかの実施形態では、PEGまたはコンジュゲートされた脂質は、脂質ナノ粒子中に存在する全脂質の0～20%（mol）を構成し得る。いくつかの実施形態では、PEGまたはコンジュゲートされた脂質含有量は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）に存在する全脂質の2～10%（mol）である。いくつかの実施形態では、PEGまたはコンジュゲートされた脂質含有量は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）に存在する全脂質の2～5%（mol）である。いくつかの実施形態では、PEGまたはコンジュゲートされた脂質含有量は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）に存在する全脂質の2～3%（mol）である。一実施形態では、PEGまたはコンジュゲートされた脂質含有量は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）に存在する全脂質の約2.5%（mol）である。いくつかの実施形態では、PEGまたはコンジュゲートされた脂質含有量は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）に存在する全脂質の約3%（mol）である。

【0167】

カチオン性脂質、例えば、イオン化可能なカチオン性脂質と、非カチオン性脂質、ステロール、およびPEG／コンジュゲートされた脂質とのモル比は、必要に応じて変えることができることが理解される。例えば、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、組成物のモルまたは全重量で30～70%のカチオン性脂質、組成物のモルまたは全重量で0～60%のコレステロール、組成物のモルまたは全重量で0～30%の非カチオン性脂質、および組成物のモルまたは全重量で1～10%のPEGまたはコンジュゲートされた脂質を含み得る。一実施形態では、組成物は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、組成物のモルまたは全重量で40～60%のカチオン性脂質、組成物のモルまたは全重量で30～50%のコレステロール、組成物のモルまたは全重量で5～15%の非カチオン性脂質、および組成物のモルまたは全重量で1～5%のPEGまたはコンジュゲートされた脂質を含む。一実施形態では、組成物は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、組成物のモル

または全重量で40～60%のカチオン性脂質、組成物のモルまたは全重量で30～40%のコレステロール、および組成物のモルまたは全重量で5～10%の非カチオン性脂質、および組成物のモルまたは全重量で1～5%のPEGまたはコンジュゲートされた脂質である。組成物は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、組成物のモルまたは全重量で60～70%のカチオン性脂質、組成物のモルまたは全重量で25～35%のコレステロール、組成物のモルまたは全重量で5～10%の非カチオン性脂質、および組成物のモルまたは全重量で0～5%のPEGまたはコンジュゲートされた脂質を含有し得る。組成物はまた、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、組成物のモルまたは全重量で最大45～55%のカチオン性脂質、組成物のモルまたは全重量で35～45%のコレステロール、および組成物のモルまたは全重量で2～15%の非カチオン性脂質、および組成物のモルまたは全重量で1～5%のPEGまたはコンジュゲートされた脂質を含有し得る。製剤はまた、例えば、組成物のモルもしくは全重量で8～30%のカチオン性脂質、組成物のモルもしくは全重量で5～15%の非カチオン性脂質、および組成物のモルもしくは全重量で0～40%のコレステロール；組成物のモルもしくは全重量で4～25%のカチオン性脂質、組成物のモルもしくは全重量で4～25%の非カチオン性脂質、組成物のモルもしくは全重量で2～25%のコレステロール、組成物のモルもしくは全重量で10～35%の複合脂質、および組成物のモルもしくは全重量で5%のコレステロール；または組成物のモルもしくは全重量で2～30%のカチオン性脂質、組成物のモルもしくは全重量で2～30%の非カチオン性脂質、組成物のモルもしくは全重量で1～15%のコレステロール、組成物のモルもしくは全重量で2～35%のPEGもしくは複合脂質、および組成物のモルもしくは全重量で1～20%のコレステロール；またはさらには組成物のモルもしくは全重量で最大90%のカチオン性脂質、および組成物のモルもしくは全重量で2～10%の非カチオン性脂質；またはさらには組成物のモルもしくは全重量で100%のカチオン性脂質を含む、脂質ナノ粒子であってもよい。いくつかの実施形態では、脂質粒子製剤は、カチオン性脂質、非カチオン性リン脂質、コレステロール、およびPEG化脂質（コンジュゲートされた脂質）を50：10：38.5：1.5のモル比で含む。

【0168】

一実施形態では、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）製剤は、カチオン性脂質、非カチオン性リン脂質、コレステロール、およびPEG化脂質（コンジュゲートされた脂質）を約50：7：40：3のモル比で含む。

【0169】

一実施形態では、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、カチオン性脂質、非カチオン性脂質（例えば、リン脂質）、ステロール（例えば、コレステロール）、およびPEG化脂質（コンジュゲートされた脂質）を含み、脂質のモル比は、カチオン性脂質の場合、20～70モルパーセントの範囲であり（目標30～60）、非カチオン性脂質のモルパーセントは、0～30の範囲であり（目標0～15）、ステロールのモルパーセントは、20～70の範囲であり（目標30～50）、PEG化脂質（コンジュゲートされた脂質）のモルパーセントは、1～6の範囲である（目標2～5）。

【0170】

ceDNAを含む脂質ナノ粒子（LNP）は、2018年9月7日に提出された国際出願第2018/050042号に開示されており、これはその全体が本明細書に組み込まれ、本明細書に開示される方法および組成物における使用が想定される。

【0171】

製剤化されたカチオン性脂質のpKaは、核酸の送達のためのLNPの有効性と関連し得る（Jayaraman et al., Angewandte Chemie, International Edition (2012), 51(34), 8529–8533, Semple et al., Nature Biotechnology 28, 172–176 (2010)を参照されたく、それらの両方は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）。一実施形態では、各カチオン性脂質のpKaは、2-（p-トリイジノ）-6-ナフタレンスルホン酸（TNS）の蛍光に基づくアッセイを使用して

、脂質ナノ粒子中で決定される。0.4 mM全脂質の濃度でのPBS中のカチオン性脂質／DSPC／コレステロール／PEG-脂質（50／10／38.5／1.5 mol%）からなる脂質ナノ粒子は、本明細書および他に記載されるインラインプロセスを使用して調製され得る。TNSは、蒸留水中の100 mMストック溶液として調製され得る。小胞は、10 mMのHEPES、10 mMのMES、10 mMの酢酸アンモニウム、130 mMのNaClを含有する2 mLの緩衝溶液中の24 mM脂質に希釈され得、pHは、2.5～11の範囲である。TNS溶液のアリコートを追加して、1 mMの最終濃度にすることができ、続いて渦流混合発光強度を、321 nmの励起波長および445 nmの発振波長を使用し、SLM Aminco Series 2 発光分光光度計において室温で測定する。S字状最良適合分析は、蛍光データに適用することができ、pKaは、半最適蛍光強度を生じるpHとして測定される。

10

【0172】

一実施形態では、相対活性は、尾静脈注入を介した投与の4時間後に肝臓内のルシフェラーゼ発現を測定することによって決定され得る。0.3および1.0 mg cDNA/kgの用量で活性を比較し、投与の4時間後に測定された肝臓1 g当たりのルシフェラーゼngとして表される。

【0173】

無制限に、本発明の脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、カプシド不含非ウイルス性DNAベクターを目的の標的部位（例えば、細胞、組織、器官など）に送達するように使用され得る脂質製剤を含む。一般に、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、カプシド不含非ウイルス性DNAベクターおよびカチオン性脂質またはその塩を含む。

20

【0174】

一実施形態では、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、カチオン性脂質／非カチオン性脂質／ステロール／コンジュゲートされた脂質を50：10：38.5：1.5のモル比で含む。別の実施形態では、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、カチオン性脂質／非カチオン性脂質／ステロール／コンジュゲートされた脂質を50：10：37.5：2.5のモル比で含む。一実施形態では、本開示は、リン脂質、レシチン、ホスファチジルコリンおよびホスファチジルエタノールアミンを含む脂質粒子製剤を提供する。

【0175】

III. 治療用核酸

30

核酸は大きく、高電荷であり、急速に分解されて身体から排出され、一般に薬理学的特性は低い。なぜなら、身体にとって異物として認識され、自然免疫応答の標的になるためである。したがって、特定の治療用核酸（「TNA」）（例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはウイルスベクター）は、インビボで免疫応答を引き起こすことが多い。本開示は、対象レシピエントの低減した免疫応答状態で治療用核酸の持続性を最大化することを通して発現レベルを増加させることにより、そのような免疫応答を改善、低減または排除し、治療用核酸の効力を増強し得る薬学的組成物および方法を提供する。これにより、遺伝子療法の過程で器官損傷または他の毒性につながり得る潜在的な有害事象を最小化することができる。

【0176】

40

本開示の例示的な治療用核酸としては、ミニ遺伝子、プラスミド、ミニサークル、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、リボザイム、閉端二本鎖DNA（例えば、cDNA、CELID、直鎖状の共有結合的に閉じたDNA（「ミニストリング」）、doggy bone（商標）、プロテロメア閉端DNA、またはダンベル直鎖状DNA）、ダイサー基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、非対称干渉RNA（aiRNA）、マイクロRNA（miRNA）、mRNA、tRNA、rRNA、およびDNAウイルスベクター、ウイルスRNAベクター、ならびにそれらの任意の組み合わせを挙げることができるが、これらに限定されない。

【0177】

50

RNA干渉 (RNAi) と呼ばれるプロセスを通じて特定のタンパク質の細胞内レベルを下方調節することができる siRNA または miRNA もまた、本発明によって核酸治療薬であると企図される。siRNA または miRNA が宿主細胞の細胞質に導入された後、これらの二本鎖 RNA 構築物は RISC と呼ばれるタンパク質に結合することができる。siRNA または miRNA のセンス鎖は RISC 複合体によって除去される。RISC 複合体は、相補的 mRNA と結合すると、mRNA を切断し、切断された鎖を放出する。RNAi は、対応するタンパク質の下方調節をもたらす mRNA の特異的破壊を誘導することによるものである。

【0178】

タンパク質への mRNA 翻訳を阻害するアンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO) およびリボザイムは、核酸治療薬となり得る。アンチセンス構築物の場合、これらの一本鎖デオキシ核酸は、標的タンパク質 mRNA の配列に相補的な配列を有し、ワトソンは、クリック塩基対合によって mRNA に結合することができる。この結合は、標的 mRNA の翻訳を防ぎ、かつ／または mRNA 転写産物の RNaseH 分解を誘起する。その結果、アンチセンスオリゴヌクレオチドは作用の特異性 (すなわち、特定の疾患関連タンパク質の下方調節) を高めた。

【0179】

本明細書で提供される方法のいずれにおいても、治療用核酸は治療用 RNA であり得る。当該治療用 RNA は、mRNA 翻訳の阻害剤、RNA 干渉 (RNAi) の薬剤、触媒的に活性な RNA 分子 (リボザイム)、転移 RNA (tRNA)、または mRNA 転写物 (ASO)、タンパク質もしくは他の分子リガンドに結合する RNA (アプタマー) であり得る。本明細書で提供される方法のいずれにおいても、RNAi の薬剤は、二本鎖 RNA、一本鎖 RNA、マイクロ RNA、短鎖干渉 RNA、低分子ヘアピン RNA、または三重らせん形成オリゴヌクレオチドであり得る。

【0180】

いくつかの実施形態によれば、治療用核酸は、閉端二本鎖 DNA、例えば、ceDNA である。いくつかの実施形態によれば、細胞における治療用タンパク質の発現および／または産生は、非ウイルス性 DNA ベクター、例えば、ceDNA ベクターに由来する。従来の AAV ベクター、さらにはレンチウイルスベクターを超える、治療用タンパク質の発現に対する ceDNA ベクターの明確な利点は、所望のタンパク質をコードする異種核酸配列にサイズの制約がないことである。したがって、大きな治療用タンパク質でさえ、単一の ceDNA ベクターから発現することができる。したがって、ceDNA ベクターを使用して、それを必要とする対象において治療用タンパク質を発現させることができる。

【0181】

一般に、本明細書に開示される治療用タンパク質の発現のための ceDNA ベクターは、5' から 3' 方向に、第 1 のアデノ随伴ウイルス (AAV) 逆位末端反復 (ITR)、目的のヌクレオチド配列 (例えば、本明細書に記載される発現カセット)、および第 2 の AAV ITR を含む。ITR 配列は、(i) 少なくとも 1 つの WT ITR および少なくとも 1 つの修飾型 AAV 逆位末端反復 (mod-ITR) (例えば、非対称の修飾型 ITR)、(ii) mod-ITR 対が互いに対して異なる三次元空間構成を有する、2 つの修飾型 ITR (例えば、非対称の修飾型 ITR)、または (iii) 各 WT-ITR が同じ三次元空間構成を有する、対称もしくは実質的に対称の WT-WT ITR 対、または (iv) 各 mod-ITR が同じ三次元空間構成を有する、対称もしくは実質的に対称の修飾型 ITR 対のうちのいずれかから選択される。

【0182】

IV. 閉端 DNA (ceDNA) ベクター

本開示の態様は、一般に、カプシド不含非ウイルス性閉端 DNA ベクターおよび脂質を含む脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) を提供する。

【0183】

本開示の実施形態は、導入遺伝子 (例えば、治療用核酸) を発現することができる閉端

10

20

30

40

50

直鎖状二重鎖 (c e D N A) ベクターを含む方法および組成物に基づく。本明細書に記載されるような c e D N A ベクターは、ウイルスカプシド内の限定空間によって課されるパッケージング制約を有しない。c e D N A ベクターは、封入された A A V ゲノムとは対照的な原核細胞的に産生されたプラスミド D N A ベクターに対する可変の真核細胞的に産生された代替物を表す。これは、制御エレメント、例えば、本明細書に開示される調節スイッチ、大きな導入遺伝子、複数の導入遺伝子などの挿入を許可する。

【0184】

プラスミド系発現ベクターとは異なる c e D N A ベクターの多くの構造特徴が存在する。c e D N A ベクターは、以下の特徴：元の（すなわち、挿入されていない）細菌 D N A の欠失、原核細胞複製起源の欠失、自蔵である（すなわち、R e p 結合および末端分解部位 (R B S および T R S) を含む 2 つの I T R 以外のいかなる配列ならびに I T R 間の外因性配列も必要としない）、真核起源（すなわち、それらは真核細胞中で産生される）のヘアピンを形成する I T R 配列の存在、ならびに細菌型 D N A メチル化、または実際に哺乳動物宿主によって異常であるとみなされる任意の他のメチル化の不在のうちの 1 つ以上を有し得る。一般に、本ベクターは、いかなる原核細胞 D N A も含有しないことが好ましいが、いくつかの原核細胞 D N A が、外因性配列として、非限定例としてプロモーターまたはエンハンサー領域に挿入されてもよいことが企図される。c e D N A ベクターをプラスミド発現ベクターと区別する別の重要な特徴は、c e D N A ベクターが、閉端を有する一本鎖直鎖状 D N A であるが、プラスミドは、常に二本鎖 D N A である。

【0185】

プラスミド系発現ベクターを超える本明細書に記載される c e D N A ベクターを使用するいくつかの利点があり、そのような利点としては、次のことが挙げられるが、これらに限定されない。1) プラスミドは、細菌 D N A 配列を含有し、原核細胞特異的メチル化、例えば、6-メチルアデノシンおよび 5-メチルシトシンメチル化に供されるが、カプシド不含 A A V ベクター配列は、真核細胞起源であり、原核細胞特異的メチル化を受けず、結果として、カプシド不含 A A V ベクターは、プラスミドと比較して炎症および免疫反応を誘導する可能性が低い。2) プラスミドは、産生プロセス中に耐性遺伝子の存在を必要とするが、c e D N A ベクターは必要としない。3) 環状プラスミドは、細胞への導入時に核に送達されず、細胞ヌクレアーゼによる分解をバイパスするために過負荷を必要とするが、c e D N A ベクターは、ヌクレアーゼに対する耐性を付与するウイルスシスエレメント、すなわち I T R を含有し、核に対して標的化され、送達されるように設計され得る。I T R 機能に不可欠な最小定義エレメントは、R e p 結合部位 (R B S、A A V 2 の場合 5'-G C G C G C T C G C T C G C T C-3' (配列番号 1)) および末端分解部位 (T R S、A A V 2 の場合 5'-A G T T G G-3') に加えて、ヘアピン形成を可能にする可変パリンドローム配列であると仮定し、4) c e D N A ベクターは、報告によれば受容体の T o l l 様ファミリーのメンバーに結合し、T 細胞媒介性免疫反応を誘起する原核細胞由来のプラスミドにおいて見出されることが多い C p G ジヌクレオチドの過剰提示を有しない。対照的に、本明細書に開示されるカプシド不含 A A V ベクターでの形質導入は、様々な送達試薬を使用し、従来の A A V ビリオンで形質導入することが困難である細胞および組織型を効率的に標的とし得る。

【0186】

c e D N A ベクターは、好ましくは、非連続的な構造ではなく直鎖状および連続的な構造を有する。直鎖状で連続的な構造は、細胞エンドヌクレアーゼによる攻撃に対してより安定であると同時に、組換えられて変異誘発を引き起こす可能性が低いと考えられる。したがって、直鎖状で連続的な構造の c e D N A ベクターは、好ましい実施形態である。連続的な直鎖状の一本鎖分子内二重鎖 c e D N A ベクターは、A A V カプシドタンパク質をコードする配列なしに、終端に共有結合している可能性がある。これらの c e D N A ベクターは、細菌起源の環状二重鎖核酸分子であるプラスミド（本明細書に記載される c e D N A プラスミドを含む）とは構造的に異なる。プラスミドの相補鎖は、変性に続いて分離されて 2 つの核酸分子を産生することができるが、反対に、c e D N A ベクターは、相補

鎖を有するが、単一DNA分子であり、したがって変性された場合でも単一分子のままである。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、プラスミドとは異なり、原核細胞タイプのDNA塩基メチル化なしに産生され得る。したがって、ceDNAベクターおよびceDNA-プラスミドは、構造（特に、直鎖状対環状）およびこれらの異なる対象物を産生および精製するために使用される方法の両方に関して、またceDNA-プラスミドの場合は原核細胞タイプおよびceDNAベクターの場合は真核細胞タイプのものである、それらのDNAメチル化に関して異なる。

【0187】

本明細書で提供されるのは、共有結合性閉端を有する非ウイルス性カプシド不含ceDNA分子（ceDNA）である。これらの非ウイルス性カプシド不含ceDNA分子は、2つの異なる逆位末端反復（ITR）配列の間に位置付けられた異種遺伝子（例えば、導入遺伝子、特に治療用導入遺伝子）を含有する発現構築物（例えば、ceDNA-プラスミド、ceDNA-バクミド、ceDNA-バキュロウイルスまたは統合型細胞株）からの許容宿主細胞中で産生され得、ITRは、互いに関して異なる。いくつかの実施形態では、ITRのうちの1つは、野生型ITR配列（例えば、AAV ITR）と比較した欠失、挿入、および／または置換によって修飾され、ITRのうちの少なくとも1つは、機能性末端分解部位（trs）およびRep結合部位を含む。ceDNAベクターは、好ましくは、発現カセットなどの分子の少なくとも一部分にわたって二重鎖、例えば、自己相補的である（例えば、ceDNAは、二本鎖環状分子ではない）。ceDNAベクターは、共有結合性閉端を有し、したがって、例えば、1時間以上37℃でエキソヌクレアーゼ消化（例えば、エキソヌクレアーゼIまたはエキソヌクレアーゼIII）に対して耐性である。

【0188】

一態様では、ceDNAベクターは、5'から3'方向に、第1のアデノ随伴ウイルス（AAV）逆位末端反復（ITR）、目的のヌクレオチド配列（例えば、本明細書に記載される発現カセット）、および第2のAAV ITRを含む。一実施形態では、第1のITR（5' ITR）および第2のITR（3' ITR）は、互いに対して非対称である。すなわち、それらは、互いに異なる三次元空間構成を有する。例示的な実施形態として、第1のITRは、野生型ITRであり得、第2のITRは、変異型または修飾型ITRであり得るか、またはその逆であり、第1のITRは、変異型または修飾型ITRであり得、第2のITRは、野生型ITRであり得る。一実施形態では、第1のITRおよび第2のITRは、両方とも修飾されているが、異なる配列であるか、または異なる修飾を有するか、または同一の修飾型ITRではなく、異なる三次元空間構成を有する。言い換えると、非対称ITRを用いるceDNAベクターは、WT-ITRに対する1つのITRのいかなる変更も他のITRに反映されないITRを有するか、あるいは非対称ITRが修飾された非対称ITR対を有する場合は、互いに対して異なる配列および異なる三次元形状を有し得る。

【0189】

一実施形態では、ceDNAベクターは、5'から3'方向に、第1のアデノ随伴ウイルス（AAV）逆位末端反復（ITR）、目的のヌクレオチド配列（例えば、本明細書に記載される発現カセット）、および第2のAAV ITRを含み、第1のITR（5' ITR）および第2のITR（3' ITR）は、互いに対して対称または実質的に対称であり、すなわち、ceDNAベクターは、対称の三次元空間構成を有するITR配列を含み得、それによりそれらの構造は、幾何学的空間で同じ形状であるか、または三次元空間で同じA、C-C'、B-B'ループを有する。そのような実施形態では、対称のITR対、または実質的に対称のITR対は、野生型ITRではない修飾型ITR（例えば、mod-ITR）であり得る。mod-ITR対は、野生型ITRからの1つ以上の修飾を有し、互いに逆相補（逆位）である同じ配列を有し得る。一実施形態では、修飾型ITR対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、修飾型ITR対は、異なる配列を有し得るが、対応するまたは同じ対称な三次元形状を有し得る。いくつかの実施形態で

は、対称の I T R、または実質的に対称の I T R は、本明細書に記載されるように野生型 (W T - I T R) であり得る。すなわち、両方の I T R が野生型配列を有するが、必ずしも同じ A A V 血清型の W T - I T R である必要はない。一実施形態では、一方の W T - I T R は、1 つの A A V 血清型に由来し得、他方の W T - I T R は、異なる A A V 血清型に由来し得る。そのような実施形態では、W T - I T R 対は、本明細書で定義されるように実質的に対称であり、すなわち、それらは、対称的な三次元空間構成を維持しながら、1 つ以上の保存的ヌクレオチド修飾を有することができる。

【0190】

本明細書に提供される野生型または変異型または他の方法で修飾された I T R 配列は、c e D N A ベクターの産生のために発現構築物 (例えば、c e D N A - プラスミド、c e D N A - バクミド、c e D N A - バキュロウイルス) に含まれる D N A 配列を表す。したがって、c e D N A - プラスミドまたは他の発現構築物から産生された c e D N A ベクター中に実際に含有される I T R 配列は、産生プロセス中に起こる天然に存在する変化 (例えば、複製エラー) の結果として、本明細書に提供される I T R 配列に対して同一であっても同一でなくてもよい。

【0191】

一実施形態では、治療用核酸配列である導入遺伝子を有する発現カセットを含む本明細書に記載される c e D N A ベクターは、導入遺伝子の発現を可能にするかまたは制御する 1 つ以上の調節配列に作動可能に連結され得る。一実施形態では、ポリヌクレオチドは、第 1 の I T R 配列および第 2 の I T R 配列を含み、目的のヌクレオチド配列は、第 1 および第 2 の I T R 配列によって隣接され、第 1 および第 2 の I T R 配列は、互いに対して非対称であるか、または互いに対して対称である。

【0192】

一実施形態では、発現カセットは、2 つの I T R 間に位置し、導入遺伝子に操作可能に連結されたプロモーター、転写後調節エレメント、ならびにポリアデニル化および終結シグナルのうちの 1 つ以上をこの順序で含む。一実施形態では、プロモーターは、調節可能 - 誘導可能または抑制可能である。プロモーターは、導入遺伝子の転写を促進する任意の配列であり得る。一実施形態では、プロモーターは、C A G プロモーターまたはその変形である。転写後調節エレメントは、導入遺伝子の発現を調整する配列であり、非限定的な例として、治療用核酸配列である導入遺伝子の発現を強化する三次構造を作成する任意の配列である。

【0193】

一実施形態では、転写後調節エレメントは、W P R E を含む。一実施形態では、ポリアデニル化および終結シグナルは、B G H ポリ A を含む。当該技術分野において既知の任意のシス調節エレメント、またはその組み合わせ、例えば、S V 4 0 後期ポリ A シグナル上流エンハンサー配列 (U E S) または他の転写後処理エレメント (限定されないが、単純ヘルペスウイルスまたは B 型肝炎ウイルス (H B V) のチミジンキナーゼ遺伝子を含む) が追加として使用され得る。一実施形態では、5' ~ 3' 配向の発現カセット長は、A A V ビリオン中でカプシド化されることが知られている最大長を超える。一実施形態では、長さは、4.6 k b 超、または 5 k b 超、または 6 k b 超、または 7 k b 超である。様々な発現カセットが、本明細書に例示される。

【0194】

一実施形態では発現カセットは、4000ヌクレオチド超、5000ヌクレオチド、10,000ヌクレオチド、もしくは20,000ヌクレオチド、もしくは30,000ヌクレオチド、もしくは40,000ヌクレオチド、または50,000ヌクレオチド、または約4000~10,000ヌクレオチド、もしくは10,000~50,000ヌクレオチドの任意の範囲、または50,000ヌクレオチド超を含み得る。いくつかの実施形態では、発現カセットは、500~50,000ヌクレオチド長の範囲の治療用核酸配列である導入遺伝子を含み得る。一実施形態では、発現カセットは、500~75,000ヌクレオチド長の範囲の治療用核酸配列である導入遺伝子を含み得る。一実施形態では

、発現カセットは、500～10,000ヌクレオチド長の範囲の治療用核酸配列である導入遺伝子を含み得る。一実施形態では、発現カセットは、1000～10,000ヌクレオチド長の範囲の治療用核酸配列である導入遺伝子を含み得る。一実施形態では、発現カセットは、500～5,000ヌクレオチド長の範囲の治療用核酸配列である導入遺伝子を含み得る。ceDNAベクターは、カプシド化AAVベクターのサイズ制限がないため、大きなサイズの発現カセットを宿主に送達することが可能である。一実施形態では、ceDNAベクターは、原核細胞特異的メチル化を欠いている。

【0195】

一実施形態では、発現カセットはまた、内部リボソームエンタリー部位(IRES)および／または2Aエレメントを含み得る。シス調節エレメントとしては、プロモーター、リボスイッチ、インスレーター、mir調節エレメント、転写後調節エレメント、組織および細胞型特異的プロモーター、ならびにエンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ITRは、導入遺伝子のプロモーターとして作用し得る。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、導入遺伝子の発現を調節するための追加の構成成分、例えば、導入遺伝子の発現を制御および調節するための調節スイッチを含み、所望であれば、ceDNAベクターを含む細胞の制御された細胞死を可能にするキルスイッチである調節スイッチを含み得る。

【0196】

一実施形態では、ceDNAベクターは、カプシド不含であり、第1のITR、発現可能な導入遺伝子カセットおよび第2のITRをこの順にコードするプラスミドから取得され得、第1および／または第2のITR配列のうちの少なくとも1つは、対応する野生型AAV2 ITR配列に関して変異する。

【0197】

一実施形態では、本明細書に開示されるceDNAベクターは、治療目的(例えば、医療、診断、もしくは獣医学的使用)または免疫原性ポリペプチドに使用される。

【0198】

発現カセットは、治療用核酸配列である任意の導入遺伝子を含むことができる。ある特定の実施形態では、ceDNAベクターは、1つ以上のポリペプチド、ペプチド、リボザイム、ペプチド核酸、siRNA、RNAis、アンチセンスオリゴヌクレオチド、アンチセンスポリヌクレオチド、抗体、抗原結合断片、またはそれらの任意の組み合わせを含む、対象における任意の目的の遺伝子を含む。

【0199】

一実施形態では、ceDNA発現カセットは、例えば、レシピエント対象において存在しない、不活性、もしくは不十分な活性であるタンパク質をコードする発現可能な外因性配列(例えば、オープンリーディングフレーム)、または所望の生物学的もしくは治療効果を有するタンパク質をコードする遺伝子を含み得る。一実施形態では、ドナー配列などの外因性配列は、欠陥遺伝子または転写産物の発現を訂正するように機能することができる遺伝子産物をコードすることができる。一実施形態では、発現カセットはまた、訂正DNA鎖をコードし、ポリペプチド、センスもしくはアンチセンスオリゴヌクレオチド、またはRNA(コードもしくは非コード;例えば、siRNA、shRNA、マイクロRNA、およびそれらのアンチセンス対応物(例えば、antagoMiR))をコードし得る。一実施形態では、発現カセットは、実験または診断の目的で使用されるレポータータンパク質をコードする外因性配列、例えばb-ラクタマーゼ、b-ガラクトシダーゼ(LacZ)、アルカリホスファターゼ、チミジンキナーゼ、緑色蛍光タンパク質(GFP)、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ(CAT)、ルシフェラーゼ、および当該技術分野において周知の他のものを含み得る。

【0200】

したがって、発現カセットは、変異のために低減もしくは欠如しているタンパク質、ポリペプチド、もしくはRNAをコードする、または過剰発現が本開示の範囲内であるとみなされる場合に治療効果をもたらす任意の遺伝子を含み得る。ceDNAベクターは、ヌ

10

20

30

40

50

クレアーゼによって提供される二本鎖切断（またはニック）の後に挿入される訂正 DNA 鎖として使用されるテンプレートまたはドナーヌクレオチド配列を含み得る。c e DNA ベクターは、誘導型 RNA ヌクレアーゼ、メガヌクレアーゼ、またはジンクフィンガーヌクレアーゼによって提供される二本鎖切断（またはニック）の後に挿入される訂正 DNA 鎖として使用されるテンプレートヌクレオチド配列を含み得る。

【0201】

好ましくは、挿入されていない細菌 DNA は存在せず、好ましくは、本明細書に提供される c e DNA 組成物中に細菌 DNA は存在しない。いくつかの例では、タンパク質は、ニックなしでコドンを変えることができる。

【0202】

一実施形態では、本明細書に記載される c e DNA ベクターの発現カセット、発現構築物、またはドナー配列で提供される配列は、宿主細胞についてコドン最適化することができる。本明細書で使用される場合、「最適化されたコドン」または「コドン最適化」という用語は、目的の脊椎動物、例えばマウスまたはヒトの細胞中の発現強化のために、少なくとも1つ、2つ以上、または相当数の未変性配列（例えば、原核細胞配列）のコドンを、その脊椎動物の遺伝子中でより頻繁にまたは最も頻繁に使用されるコドンと置き換えることによって、核酸配列を修飾するプロセスを指す。様々な種は、特定のアミノ酸のある特定のコドンに対して特定の偏向を呈する。

【0203】

典型的に、コドン最適化は、元の翻訳されたタンパク質のアミノ酸配列を変更しない。最適化されたコドンは、例えば、Aptagen の Gene Forge（登録商標）コドン最適化およびカスタム遺伝子合成プラットフォーム（Aptagen, Inc., 2190 Fox Mill Rd. Suite 300, Herndon, Va. 20171）または別の公開データベースを使用して決定することができる。

【0204】

多くの生物は、特定のコドンを使用して、成長するペプチド鎖における特定のアミノ酸の挿入をコードする偏向を示す。生物間のコドン使用頻度の違いであるコドン優先またはコドン偏向は、遺伝暗号の縮退によってもたらされ、多くの生物の間で十分に文書化されている。コドン偏向は、メッセンジャー RNA (mRNA) の翻訳効率と相関関係があることが多く、特に翻訳されるコドンの特性および特定の転移 RNA (tRNA) 分子の可用性に依存すると考えられている。細胞内の選択された tRNA の優勢は、一般にペプチド合成で最も頻繁に使用されるコドンの反映である。したがって、コドン最適化に基づいて、所与の生物における最適な遺伝子発現のために遺伝子を調整することができる。

【0205】

多種多様な動物、植物、および微生物種で利用可能な多数の遺伝子配列を考えると、コドン使用頻度の相対頻度を計算することが可能である (Nakamura, Y., et al. "Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000" Nucl. Acids Res. 28:292 (2000))。

【0206】

プラスミド系発現ベクターとは異なる c e DNA ベクターの多くの構造特徴が存在する。c e DNA ベクターは、以下の特徴：元の（すなわち、挿入されていない）細菌 DNA の欠失、原核細胞複製起源の欠失、自蔵である（すなわち、Rep 結合および末端分解部位 (RBS および TRS) を含む 2 つの ITR 以外のいかなる配列ならびに ITR 間の外因性配列も必要としない）、真核起源（すなわち、それらは真核細胞中で産生される）のヘアピンを形成する ITR 配列の存在、ならびに細菌型 DNA メチル化、または実際に哺乳動物宿主によって異常であるとみなされる任意の他のメチル化の不在のうちの 1 つ以上を有し得る。一般に、本ベクターは、いかなる原核細胞 DNA も含有しないことが好ましいが、いくつかの原核細胞 DNA が、外因性配列として、非限定例としてプロモーターま

10

20

30

40

50

たはエンハンサー領域に挿入されてもよいことが企図される。c e D N Aベクターをプラスミド発現ベクターと区別する別の重要な特徴は、c e D N Aベクターが、閉端を有する一本鎖直鎖状D N Aであるが、プラスミドは、常に二本鎖D N Aである。

【0207】

一実施形態では、本明細書に提供される方法によって産生されたc e D N Aベクターは、好ましくは、非連続的な構造ではなく直鎖状で連続的な構造を有する。直鎖状で連続的な構造は、細胞エンドヌクレアーゼによる攻撃に対してより安定であると同時に、組換えられて変異誘発を引き起こす可能性が低いと考えられる。したがって、直鎖状で連続的な構造のc e D N Aベクターは、好ましい実施形態である。連続的な直鎖状の一本鎖分子内二重鎖c e D N Aベクターは、A A Vカプシドタンパク質をコードする配列なしに、終端に共有結合している可能性がある。これらのc e D N Aベクターは、細菌起源の環状二重鎖核酸分子であるプラスミド（本明細書に記載されるc e D N Aプラスミドを含む）とは構造的に異なる。プラスミドの相補鎖は、変性に続いて分離されて2つの核酸分子を産生することができるが、反対に、c e D N Aベクターは、相補鎖を有するが、単一D N A分子であり、したがって変性された場合でも単一分子のままである。いくつかの実施形態では、本明細書に記載されるc e D N Aベクターは、プラスミドとは異なり、原核細胞タイプのD N A塩基メチル化なしに産生され得る。したがって、c e D N Aベクターおよびc e D N A－プラスミドは、構造（特に、直鎖状対環状）ならびにこれらの異なる対象物を産生および精製するために使用される方法の両方に関して、またc e D N A－プラスミドの場合は原核細胞タイプおよびc e D N Aベクターの場合は真核細胞タイプのものである、それらのD N Aメチル化に関して異なる。

【0208】

実施例1.

いくつかの実施形態によれば、合成c e D N Aは、二本鎖D N A分子からの切除を介して産生される。c e D N Aベクターの合成産生は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、2019年1月18日に出願された国際出願第19/14122号の実施例2～6に記載される。二本鎖D N A分子の切除を伴う合成方法を使用してc e D N Aベクターを産生する1つの例示的な方法。簡潔には、c e D N Aベクターは、二本鎖D N A構築物を使用して生成され得る。例えば、P C T / U S 19 / 14122の図7A～8Eを参照されたい。いくつかの実施形態では、二本鎖D N A構築物はc e D N Aプラスミドであり、例えば、2018年12月6日に出願された国際特許出願第2018/064242号の図6を参照されたい）。

【0209】

いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターを作製するための構築物（例えば、合成A A Vベクター）は、導入遺伝子の発現を調節するための追加成分、例えば、導入遺伝子の発現を調節するための調節スイッチ、またはベクターを含む細胞を殺傷し得るキルスイッチを含む。

【0210】

分子調節スイッチは、シグナルに反応して、状態の測定可能な変化を生成するものである。そのような調節スイッチは、本明細書に記載されるc e D N Aベクターと有用に組み合わせて、導入遺伝子の発現の出力を制御することができる。いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターは、導入遺伝子の発現を微調整するのに役立つ調節スイッチを含む。例えば、c e D N Aベクターの生物学的封じ込め機能として役立ち得る。いくつかの実施形態では、スイッチは、c e D N Aベクターにおける目的の遺伝子の、制御可能かつ調節可能な発現を開始または停止（すなわち、シャットダウン）するように設計された「オン／オフ」スイッチである。いくつかの実施形態では、スイッチは、一旦スイッチが起動されると、合成c e D N Aベクターを含む細胞がプログラム細胞死を受けるよう指示することができる「キルスイッチ」を含み得る。c e D N Aベクターでの使用に包含される例示的な調節スイッチは、導入遺伝子の発現を調節するために使用することができ、参照により全体が本明細書に組み込まれかつ本明細書に記載される国際出願第18/49996号

においてより完全に考察されている。

【0211】

様々なオリゴヌクレオチドの集成を伴う合成方法を使用してc e D N Aベクターを産生する別の例示的な方法は、P C T / U S 1 9 / 1 4 1 2 2の実施例3に提供されており、c e D N Aベクターは、5'オリゴヌクレオチドおよび3' I T Rオリゴヌクレオチドを合成し、I T Rオリゴヌクレオチドを、発現カセットを含む二本鎖ポリヌクレオチドにライゲーションすることによって産生される。参照により全体が本明細書に組み込まれるP C T / U S 1 9 / 1 4 1 2 2の図11Bは、5' I T Rオリゴヌクレオチドおよび3' I T Rオリゴヌクレオチドを、発現カセットを含む二本鎖ポリヌクレオチドにライゲーションする例示的な方法を示す。

10

【0212】

合成方法を使用してc e D N Aベクターを産生する例示的な方法は、参照により全体が本明細書に組み込まれるP C T / U S 1 9 / 1 4 1 2 2の実施例4において提供され、センス発現カセット配列に隣接しアンチセンス発現カセットに隣接する2つのアンチセンスI T Rに共有結合的に結合される2つのセンスI T Rを含む一本鎖の直鎖状D N Aを使用し、次いで、この一本鎖の直鎖状D N Aの末端をライゲーションして、閉端一本鎖分子を形成する。非限定的な一例は、一本鎖D N A分子を合成および／または産生し、分子の一部をアニーリングして、二次構造の1つ以上の塩基対合領域を有する単一の直鎖状D N A分子を形成し、次いで遊離5'および3'末端を互いにライゲーションして、閉鎖状一本鎖分子を形成する。

20

【0213】

さらに別の態様では、本発明は、非ウイルス性D N Aベクターの産生に使用するため、本明細書に記載されるD N Aベクターポリヌクレオチド発現テンプレート（c e D N Aテンプレート）をそれら自体のゲノムに安定して組み込んでいる宿主細胞株を提供する。そのような細胞株を産生する方法は、L e e , L . e t a l . (2 0 1 3) P l o s O n e 8 (8) : e 6 9 8 7 9に記載されており、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。好ましくは、R e pタンパク質（例えば、実施例1に記載されるとおり）は、3のM O Iで宿主細胞に添加される。一実施形態では、宿主細胞株は無脊椎動物の細胞株、好ましくは昆虫S f 9細胞である。宿主細胞株が哺乳動物細胞株、好ましくは293細胞である場合、細胞株は、安定して組み込まれたポリヌクレオチドベクターテンプレートを有し得、ヘルペスウイルスなどの第2のベクターを使用して、R e pタンパク質を細胞に導入することができ、R e pの存在下でのc e D N Aの切除および増幅を可能にする。

30

【0214】

任意のプロモーターは、ベクターポリヌクレオチドの異種核酸（例えば、レポーター核酸または治療用導入遺伝子）に操作可能に連結することができる。発現カセットは、C A Gプロモーターなどの合成調節エレメントを含有し得る。C A Gプロモーターは、(i) サイトメガロウイルス（C M V）早期エンハンサーエレメント、(i i) プロモーター、ニワトリベータアクチン遺伝子の第1のエクソンおよび第1のイントロン、ならびに(i i) ウサギベータグロビン遺伝子のスプライスアクセプターを含む。代替的に、発現カセットは、アルファ1-アンチトリプシン（A A T）プロモーター、肝臓特異的（L P 1）プロモーター、またはヒト伸長因子1アルファ（E F 1- α ）プロモーターを含むことができる。いくつかの実施形態では、発現カセットは、1つ以上の構成的プロモーター、例えば、レトロウイルスラウス肉腫ウイルス（R S V）L T Rプロモーター（任意選択的にR S Vエンハンサーを有する）、サイトメガロウイルス（C M V）最初期プロモーター（任意選択的にC M Vエンハンサーを有する）を含む。代替的に、誘導性もしくは抑制性プロモーター、導入遺伝子の未変性プロモーター、組織特異的プロモーター、または当該技術分野において既知の様々なプロモーターを使用することができる。遺伝子療法のための好適な導入遺伝子は、当業者に周知である。

40

【0215】

カプシド不含c e D N Aベクターはまた、シス調節エレメント、またはシス調節エレメ

50

ントの組み合わせをさらに含むベクターポリヌクレオチド発現構築物から産生され得、非限定的な例は、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント (WPRE) および BGH ポリ A、または例えば、ベーターグロビンポリ A を含む。他の転写後処理エレメントは、例えば、単純ヘルペスウイルス、または B 型肝炎ウイルス (HBV) のチミジンキナーゼ遺伝子を含む。発現カセットは、例えば、ウシ BGHPA もしくはウイルス SV40 pA から単離された天然、または合成などの、当該技術分野において既知の任意のポリアデニル化配列またはその変形を含み得る。いくつかの発現カセットはまた、SV40 後期ポリ A シグナル上流エンハンサー (USE) 配列を含み得る。USE は、SV40 pA または異種ポリ A シグナルと組み合わせて使用され得る。

【0216】

10

本明細書に記載される DNA ベクターを細胞から採取および収集するための時間は、ceDNA ベクターの高収率産生を達成するために選択され、最適化され得る。例えば、採取時間は、細胞生存率、細胞形態、細胞増殖などを考慮して選択され得る。一実施形態では、細胞は、十分な条件下で増殖し、DNA ベクターを産生するためのバキュロウイルス感染から十分な時間が経過した後、但し細胞の大半がウイルスの毒性のために死滅し始める前に採取される。DNA ベクターは、Qiagen Endo-Free プラスミドキットなどのプラスミド精製キットを使用して単離され得る。プラスミド単離のために開発された他の方法もまた、DNA ベクターに対して適合され得る。一般に、任意の核酸精製方法が採用され得る。

【0217】

20

DNA ベクターは、DNA の精製のための当業者に既知の任意の手段によって精製され得る。一実施形態では、ceDNA ベクターは、DNA 分子として精製される。別の実施形態では、ceDNA ベクターは、エキソソームまたは微粒子として精製される。

【0218】

一実施形態では、カプシド不含非ウイルス性 DNA ベクターは、第 1 のアデノ随伴ウイルス (AAV) 逆位末端反復 (ITR)、目的のヌクレオチド配列 (例えば、外因性 DNA の発現カセット) および修飾 AAV ITR をこの順で含むポリヌクレオチドテンプレートを含むプラスミドを含むか、またはそれから得られ、当該テンプレート核酸分子は、AAV カプシドタンパク質コードを欠いている。さらなる実施形態では、本発明の核酸テンプレートは、ウイルス性カプシドタンパク質コード配列を欠いている (すなわち、AAV カプシド遺伝子だけでなく、他のウイルスのカプシド遺伝子も欠いている)。加えて、特定の実施形態では、テンプレート核酸分子はまた、AAV Rep タンパク質コード配列を欠いている。したがって、好ましい実施形態では、本発明の核酸分子は、機能的な AAV キャップおよび AAV rep 遺伝子の両方を欠いている。

30

【0219】

一実施形態では、ceDNA ベクターは、本明細書に開示される野生型 AAV2 ITR に関して変異した ITR 構造を含み得るが、依然として操作可能な RBE、TRS、および RBE' 部分を保持する。

【0220】

逆位末端反復 (ITR)

40

本明細書に記載されるように、一実施形態では、ceDNA ベクターは、共有結合性末端 (直鎖状で連続的な非カプシド構造) を有する相補的 DNA の連続鎖から形成されたカプシド不含直鎖状二重鎖 DNA 分子であり、異なるか、または互いに対して非対称である 5' 逆位末端反復 (ITR) 配列および 3' ITR 配列を含む。ITR のうち少なくとも 1 つは、機能的末端分解部位および複製タンパク質結合部位 (RPS) (複製タンパク質結合部位と呼ばれることもある)、例えば、Rep 結合部位を含む。一般に、ceDNA ベクターは、少なくとも 1 つの修飾型 AAV 逆位末端反復配列 (ITR)、すなわち、他の ITR に対する欠失、挿入、および／または置換、ならびに発現可能な導入遺伝子を含む。

【0221】

50

一実施形態では、ITRのうちの少なくとも1つは、AAV ITR、例えば、野生型 AAV ITRである。一実施形態では、ITRのうちの少なくとも1つは、他のITR に対する修飾型ITRであり、すなわち、ceDNAは、互いに対して非対称であるITRを含む。一実施形態では、ITRのうちの少なくとも1つは、非機能的ITRである。
【0222】

一実施形態では、ceDNAベクターは、(1) シス調節エレメント、プロモーター、および少なくとも1つの導入遺伝子を含む発現カセット；(2) 少なくとも1つの導入遺伝子に操作可能に連結されたプロモーター；ならびに(3) 当該発現カセットに隣接する2つの自己相補的配列、例えば、ITRを含み、ceDNAベクターは、カプシドタンパク質と関連していない。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、AAVゲノム中で見出される2つの自己相補的配列を含み、少なくとも1つは、操作的Rep結合エレメント(RBE)およびAAVの末端分解部位(trs)またはRBEの機能的バリエーション、および導入遺伝子に作動可能に連結された1つ以上のシス調節エレメントを含む。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、導入遺伝子の発現を調節するための追加の構成成分、例えば、導入遺伝子の発現を制御および調節するための調節スイッチを含み、ceDNAベクターを含む細胞の制御された細胞死を可能にするキルスイッチである調節スイッチを含み得る。

【0223】

一実施形態では、2つの自己相補的配列は、任意の既知のパルボウイルス、例えばAAV (例えば、AAV1~AAV12) などのディペンドウイルスからのITR配列であり得る。ヘアピン二次構造形成を可能にする可変パルンドローム配列に加えて、5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (配列番号1) などのRep結合部位(RBS) および末端分解部位(trs)を保持する修飾型AAV2 ITR配列を含むが、これらに限定されない任意のAAV血清型を使用することができる。いくつかの実施形態では、ITRは、合成であり得る。一実施形態では、合成ITRは、2つ以上のAAV血清型からのITR配列に基づいている。別の実施形態では、合成ITRは、AAVベース配列を含まない。さらに別の実施形態では、合成ITRは、上記のITR構造を保存するが、わずかなAAV源配列を有するか、またはまったく有しない。いくつかの態様において、合成ITRは、野生型Repまたは特定の血清型のRepと優先的に相互作用し得るか、または場合によっては、野生型Repによって認識されず、変異Repによってのみ認識される。いくつかの実施形態では、ITRは、ヘアピン二次構造形成を可能にする可変パルンドローム配列に加えて、5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (配列番号1) などの機能性Rep結合部位(RBS) および末端分解部位(TRS)を保持する合成ITR配列である。いくつかの例では、修飾型ITR配列は、RBS、trsの配列、ならびに野生型AAV2 ITRの対応する配列からの1つのITRヘアピン二次構造の末端ループ部分を形成するRep結合エレメントの構造および位置を保持する。ceDNAベクターで使用するための例示的なITR配列は、表2~9、10Aおよび10B、配列番号2、52、101~449および545~547に開示され、部分的なITR配列は、2018年9月7日出願されたPCT出願第18/49996号の図26A~26Bに示され、それらの各々の内容は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、ceDNAベクターは、表2、3、4、5、6、7、8、9、10Aおよび10B、2018年9月7日出願されたPCT出願第18/49996号のいずれか1つ以上に示されるITR配列またはITR部分配列における修飾のうちのいずれかに対応するITRにおける修飾を伴うITRを含み得る。

【0224】

一実施形態では、ceDNAベクターは、シス調節エレメントの特定の組み合わせをさらに含む発現構築物から産生され得る。シス調節エレメントとしては、プロモーター、リボスイッチ、インスレーター、mir調節エレメント、転写後調節エレメント、組織および細胞型特異的プロモーター、ならびにエンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、ITRは、導入遺伝子のプロモーターとして作用し得る

10

20

30

40

50

。いくつかの実施形態では、c e D N Aベクターは、導入遺伝子の発現を調節するための追加成分、例えば、2018年9月7日出願されたPCT出願番号18/49996号に記載される調節スイッチを含み、導入遺伝子、またはc e D N Aベクターを含む細胞を殺傷し得るキルスイッチの発現を調節する。

【0225】

一実施形態では、発現カセットはまた、導入遺伝子の発現を増加させるために、転写後エレメントを含み得る。一実施形態では、ウッドチャック肝炎ウイルス(WHP)転写後調節エレメント(WPRE)を使用して、導入遺伝子の発現を増加させる。他の転写後処理エレメント、例えば、単純ヘルペスウイルスまたはB型肝炎ウイルス(HBV)のチミジンキナーゼ遺伝子からの転写後エレメントを使用することができる。分泌配列は、導入遺伝子、例えば、VH-02およびVK-A26配列に連結され得る。発現カセットは、例えば、ウシBGHPAもしくはウイルスSV40pAから単離された天然配列、または合成配列などの、当該技術分野において既知のポリアデニル化配列またはその変形を含み得る。いくつかの発現カセットはまた、SV40後期ポリAシグナル上流エンハンサー(USE)配列を含み得る。USEは、SV40pAまたは異種ポリAシグナルと組み合わせて使用され得る。

【0226】

2018年9月7日出願され、参照により全体が本明細書に組み込まれる国際出願第2018/050042号の図1A~1Cは、非限定の例示的なc e D N Aベクター、またはc e D N Aプラスミドの対応する配列の概略図を示す。c e D N Aベクターは、カプシド不含であり、第1のITR、発現可能な導入遺伝子カセットおよび第2のITRをこの順にコードするプラスミドから取得され得、第1および/または第2のITR配列のうちの少なくとも1つは、対応する野生型AAV2 ITR配列に関して変異する。発現可能な導入遺伝子カセットは、好ましくは、エンハンサー/プロモーター、ORFレポーター(導入遺伝子)、転写後調節エレメント(例えば、WPRE)、ならびにポリアデニル化および終結シグナル(例えば、BGHPA)のうちの1つ以上をこの順序で含む。

【0227】

プロモーター：

上記のものを含む好適なプロモーターは、ウイルスに由来し得るため、ウイルスプロモーターと称され得るか、またはそれらは、原核生物または真核生物を含む任意の生物に由来し得る。好適なプロモーターを使用して、任意のRNAポリメラーゼ(例えば、pol I、pol II、pol III)によって発現を駆動することができる。例示的なプロモーターとしては、SV40初期プロモーター、マウス乳腺腫瘍ウイルス長末端配列(LTR)プロモーター、アデノウイルス主要後期プロモーター(Ad MLP)、単純ヘルペスウイルス(HSV)プロモーター、CMV最初期プロモーター領域(CMVTE)などのサイトメガロウイルス(CMV)プロモーター、ラウス肉腫ウイルス(RSV)プロモーター、ヒトU6小核プロモーター(U6、例えば、(Miyagishi et al., Nature Biotechnology 20, 497-500 (2002))、強化U6プロモーター(例えば、Xia et al., Nucleic Acids Res. 2003 Sep. 1; 31(17))、ヒトH1プロモーター(H1)、CAGプロモーター、ヒトα1-抗チブシン(HAAT)プロモーター(例えば、など)が挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、これらのプロモーターは、それらの下流イントロン含有端で変更されて、1つ以上のヌクレアーゼ切断部位を含む。一実施形態では、ヌクレアーゼ切断部位を含有するDNAは、プロモーターDNAに対して外来である。

【0228】

一実施形態では、プロモーターは、1つ以上の特定の転写調節配列を含むことにより、発現をさらに増強する、および/またはその空間的発現および/または時間的発現を変更することができる。プロモーターはまた、転写の開始部位から数千塩基対も離れて位置し得る遠位エンハンサーまたはリプレッサーエレメントを含み得る。プロモーターは、ウイ

ルス、細菌、真菌、植物、昆虫、および動物を含む供給源に由来し得る。プロモーターは、発現が起こる細胞、組織または器官に関して、または発現が起こる発達段階に関して、または生理学的ストレス、病原体、金属イオン、または誘導剤などの外部刺激に応答して、構成的または示差的に遺伝子成分の発現を調節し得る。プロモーターの代表的な例としては、バクテリオファージT7プロモーター、バクテリオファージT3プロモーター、SP6プロモーター、lacオペレータープロモーター、tacプロモーター、SV40後期プロモーター、SV40初期プロモーター、RSV-LTRプロモーター、CMV IEプロモーター、SV40初期プロモーターまたはSV40後期プロモーターおよびCMV IEプロモーター、ならびに以下に列挙されるプロモーターが挙げられる。そのようなプロモーターおよび／またはエンハンサーは、目的の任意の遺伝子、例えば、治療用タンパク質（の発現に使用できる。例えば、ベクターは、治療用タンパク質をコードする核酸配列に操作可能に連結されるプロモーターを含み得る。一実施形態では、治療用タンパク質コード配列に操作可能に連結されたプロモーターは、シミアンウイルス40（SV40）由来のプロモーター、マウス乳がんウイルス（MMTV）プロモーター、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）プロモーター、例えば、ウシ免疫不全ウイルス（BIV）の長い末端反復（LTR）プロモーター、モロニーウイルスプロモーター、トリ白血病ウイルス（ALV）プロモーター、サイトメガロウイルス（CMV）プロモーター、例えば、CMV最初期プロモーター、エプスタインバーウイルス（EBV）プロモーター、またはラウス肉腫ウイルス（RSV）プロモーターであり得る。一実施形態では、プロモーターはまた、ヒトユビキチンC（hUbC）、ヒトアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋肉クレアチン、またはヒトメタロチオネインなどのヒト遺伝子からのプロモーターであってもよい。プロモーターはまた、天然または合成の、組織特異的プロモーター、例えば、肝臓特異的プロモーター、例えば、ヒトアルファ₁-抗トリプシン（HAAT）であり得る。一実施形態では、肝臓への送達は、肝細胞の表面上に存在する低密度リポタンパク質（LDL）受容体を介して、肝細胞へのcDNAベクターを含む組成物の内因性Apoe特異的標的を使用して達成され得る。

【0229】

一実施形態では、使用されるプロモーターは、治療タンパク質をコードする遺伝子の未変性プロモーターである。治療用タンパク質をコードするそれぞれの遺伝子のプロモーターおよび他の調節配列は既知であり、特徴付けられている。使用されるプロモーター領域は、1つ以上の追加の調節配列（例えば、未変性）、例えば、エンハンサーをさらに含み得る。

【0230】

本発明に従って使用するための好適なプロモーターの非限定例としては、例えば、CAGプロモーター、HAATプロモーター、ヒトEF1- α プロモーター、またはEF1- α プロモーターおよびラットEF1- α プロモーターの断片が挙げられる。

【0231】

ポリアデニル化配列：

ポリアデニル化配列をコードする配列は、cDNAベクターから発現されたmRNAを安定化するため、および核輸送および翻訳を助けるために、cDNAベクター中に含まれ得る。一実施形態では、cDNAベクターは、ポリアデニル化配列を含まない。他の実施形態では、ベクターは、少なくとも1、少なくとも2、少なくとも3、少なくとも4、少なくとも5、少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも45、少なくとも50以上のアデニンジヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態では、ポリアデニル化配列は、約43ヌクレオチド、約40～50ヌクレオチド、約40～55ヌクレオチド、約45～50ヌクレオチド、約35～50ヌクレオチド、またはその間の任意の範囲を含む。

【0232】

一実施形態では、cDNAは、2つの異なる逆位末端反復配列（LTR）（例えば、AAV LTR）の間に作動可能に位置付けられた異種核酸をコードするベクターポリヌ

10

20

30

40

50

クレオチドから取得可能であり、I T Rのうちの少なくとも1つは、末端分解部位および複製タンパク質結合部位（R P S）、例えば、R e p結合部位（例えば、w t A A V I T R）を含み、I T Rのうちの1つは、他のI T R、例えば機能的I T Rに関する欠失、挿入、または置換を含む。

【0233】

一実施形態では、宿主細胞はウイルスカプシドタンパク質を発現せず、ポリヌクレオチドベクターテンプレートは任意のウイルスカプシドコード配列を欠いている。一実施形態では、ポリヌクレオチドベクターテンプレートは、A A Vカプシド遺伝子を欠いているが、他のウイルスのカプシド遺伝子も欠いている。一実施形態では、核酸分子はまた、A A V R e pタンパク質コード配列を欠いている。したがって、いくつかの実施形態では、本発明の核酸分子は、機能的なA A VキャップおよびA A V r e p遺伝子の両方を欠いている。

10

【0234】

一実施形態では、c e D N Aベクターは、修飾型I T Rを有しない。

【0235】

一実施形態では、c e D N Aベクターは、本明細書に開示される（または、2018年9月7日に出願されたP C T出願第18/49996号において）調節スイッチを含む。

【0236】

V. c e D N Aベクターの産生

本明細書で定義される非対称I T R対または対称I T R対を含む本明細書に記載のc e D N Aベクターの産生のための方法は、2018年9月7日に出願されたP C T/US18/49996のセクションI Vに記載されており、これは参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書に記載されるように、c e D N Aベクターは、例えば、a) ポリヌクレオチド発現構築物テンプレート（例えば、c e D N A－プラスミド、c e D N A－バクミド、および／またはc e D N A－バキュロウイルス）を内包する宿主細胞（例えば、昆虫細胞）の集団をインキュベートするステップであって、R e pタンパク質の存在下では、宿主細胞内のc e D N Aベクターの産生を誘導するために効果的な条件下、かつそのために十分な時間にわたってウイルスカプシドコード配列を欠いており、宿主細胞が、ウイルスカプシドコード配列を含まない、インキュベートするステップと、b) c e D N Aベクターを宿主細胞から採取し、単離するステップと、を含むプロセスによって取得され得る。R e pタンパク質の存在は、修飾型I T Rを有するベクターポリヌクレオチドの複製を誘導して、宿主細胞中でc e D N Aベクターを産生する。

20

30

【0237】

しかしながら、ウイルス粒子（例えば、A A Vビリオン）は発現されない。したがって、A A Vまたは他のウイルススペースベクターにおいて天然に課されるものなどのサイズ制限はない。

【0238】

宿主細胞から単離されたc e D N Aベクターの存在は、宿主細胞から単離されたD N Aをc e D N Aベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化し、消化されたD N A材料を非変性ゲル上で分析して、直鎖状かつ非連続的なD N Aと比較して特徴的な直鎖状かつ連続的なD N Aのバンドの存在を確認することによって確認され得る。

40

【0239】

一実施形態では、本発明は、例えば、L e e , L . e t a l . (2013) P l o s O n e 8 (8) : e 6 9 8 7 9に記載されるように、非ウイルスD N Aベクターの産生において、D N Aベクターポリヌクレオチド発現テンプレート（c e D N Aテンプレート）をそれら自体のゲノムに安定して組み込んでいる宿主細胞株の使用を提供する。好ましくは、R e pは、約3のM O Iで宿主細胞に付加される。宿主細胞株が哺乳動物細胞株、例えば、H E K 2 9 3細胞である場合、細胞株は、安定して組み込まれたポリヌクレオチドベクターテンプレートを有し得、ヘルペスウイルスなどの第2のベクターを使用して、R e pタンパク質を細胞に導入することができ、R e pおよびヘルパーウイルスの存在下

50

での c e D N A の切除および増幅を可能にする。

【0240】

一実施形態では、本明細書に記載される c e D N A ベクターを作製するために使用される宿主細胞は、昆虫細胞であり、バキュロウイルスは、R e p タンパク質をコードするポリヌクレオチドと、c e D N A の非ウイルス性 D N A ベクターポリヌクレオチド発現構築物テンプレートとを両方送達するために使用される。いくつかの実施形態では、宿主細胞は、R e p タンパク質を発現するために操作される。

【0241】

次いで、c e D N A ベクターは、宿主細胞から採取され、単離される。本明細書に記載される c e D N A ベクターを細胞から採取するための時間は、c e D N A ベクターの高収率産生を達成するために選択され、最適化され得る。例えば、採取時間は、細胞生存率、細胞形態、細胞増殖などを考慮して選択され得る。一実施形態では、細胞は、十分な条件下で増殖し、c e D N A ベクターを産生するためのバキュロウイルス感染から十分な時間が経過した後、但し細胞の大半がバキュロウイルスの毒性のために死滅し始める前に採取される。D N A -ベクターは、Q i a g e n E n d o - F r e e プラスミドキットなどのプラスミド精製キットを使用して単離され得る。プラスミド単離のために開発された他の方法もまた、D N A -ベクターに対して適合され得る。一般に、任意の核酸精製方法が採用され得る。

【0242】

D N A ベクターは、D N A の精製のための当業者に既知の任意の手段によって精製され得る。一実施形態では、c e D N A ベクターは、D N A 分子として精製される。一実施形態では、c e D N A ベクターは、エキソソームまたは微粒子として精製される。c e D N A ベクターの存在は、細胞から単離されたベクター D N A を D N A ベクター上に単一認識部位を有する制限酵素で消化すること、ならびにゲル電気泳動を使用し、消化された D N A 材料および未消化の D N A 材料の両方を分析して、直鎖状かつ非連続的な D N A と比較して特徴的な直鎖状かつ連続的な D N A の存在を確認することによって確認され得る。

【0243】

c e D N A プラスミド

c e D N A -プラスミドは、c e D N A ベクターの後期産生に使用されるプラスミドである。一実施形態では、c e D N A -プラスミドは、転写方向の作動可能に連結された構成成分として、少なくとも（１）修飾型 5' I T R 配列、（２）シス調節エレメントを含有する発現カセット、例えば、プロモーター、誘導性プロモーター、調節スイッチ、エンハンサーなど、および（３）修飾型 3' I T R 配列（3' I T R 配列は、5' I T R 配列に対して非対称である）を提供する既知の技法を使用して構築され得る。いくつかの実施形態では、I T R によって隣接された発現カセットは、外因性配列を導入するためのクローニング部位を含む。発現カセットは、A A V ゲノムの r e p および c a p コード領域を置き換える。

【0244】

一実施形態では、c e D N A ベクターは、本明細書では、第 1 のアデノ随伴ウイルス（A A V）逆位末端反復（I T R）、導入遺伝子を含む発現カセット、および変異型または修飾型 A A V I T R をこの順序でコードする「c e D N A -プラスミド」と参照されるプラスミドから取得され、当該 c e D N A -プラスミドは、A A V カプシドタンパク質コード配列を欠いている。代替実施形態では、c e D N A -プラスミドは、第 1 の（または 5'）修飾型または変異型 A A V I T R、導入遺伝子を含む発現カセット、および第 2 の（または 3'）修飾型 A A V I T R をこの順序でコードし、当該 c e D N A -プラスミドは、A A V カプシドタンパク質コード配列を欠いており、5' および 3' I T R は、互いに対して対称である。代替実施形態では、c e D N A -プラスミドは、第 1 の（または 5'）修飾型または変異型 A A V I T R、導入遺伝子を含む発現カセット、および第 2 の（または 3'）変異型または修飾型 A A V I T R をこの順序でコードし、当該 c e D N A -プラスミドは、A A V カプシドタンパク質コード配列を欠いており、5' および 3' 修飾型 I

10

20

30

40

50

T Rは、同じ修飾を有する（すなわち、それらは互いに対して逆相補または対称である）。
【0245】

一実施形態では、c e D N A－プラスミド系は、ウイルスカプシドタンパク質コード配列を欠いている（すなわち、A A Vカプシド遺伝子だけでなく、他のウイルスのカプシド遺伝子も欠いている）。追加として、特定の実施形態では、c e D N A－プラスミドはまた、A A V R e pタンパク質コード配列を欠いている。したがって、好ましい実施形態では、c e D N A－プラスミドは、機能的A A V c a pおよびA A V r e p遺伝子（A A V 2の場合G G－3'）に加えて、ヘアピン形成を可能にする可変パリンドローム配列を欠いている。一実施形態では、本開示のc e D N A－プラスミドは、当該技術分野において周知の任意のA A V血清型のゲノムの天然ヌクレオチド配列を使用して生成され得る。一実施形態では、c e D N A－プラスミド骨格は、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 5、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 10、A A V 11、A A V 12、A A V r h 8、A A V r h l 0、A A V－D J、およびA A V－D J 8ゲノムに由来し、例えば、NCBI:NC 002077、NC 001401、NC 001729、NC 001829、NC 006152、NC 006260、NC 006261、Kot in and Smith, The Springer Index of Viruses, Springerが管理するURLで入手可能である。一実施形態では、c e D N A－プラスミド骨格は、A A V 2ゲノムに由来する。一実施形態では、c e D N A－プラスミド骨格は、これらのA A Vゲノムのうちの1つに由来する5'および3' I T Rに含まれるように遺伝子操作された合成骨格である。

10

20

【0246】

一実施形態では、c e D N A－プラスミドは、c e D N Aベクター産生細胞株の確立における使用のための選択可能または選択マーカーを任意選択的に含み得る。一実施形態では、選択マーカーは、3' I T R配列の下流（すなわち、3'）に挿入され得る。別の実施形態では、選択マーカーは、5' I T R配列の上流（すなわち、5'）に挿入され得る。適切な選択マーカーは、例えば、薬物耐性を付与するものを含む。選択マーカーは、例えば、プラスチジンS耐性遺伝子、カナマイシン、ゲネチシンなどであり得る。好ましい実施形態では、薬物選択マーカーは、プラスチジンS耐性遺伝子である。

【0247】

一実施形態では、例示的なc e D N A（例えば、r A A V O）は、r A A Vプラスミドから産生される。r A A Vベクターの産生のための方法は、（a）宿主細胞に上記のようなr A A Vプラスミドを提供することであって、宿主細胞およびプラスミドの両方が、カプシドタンパク質コード遺伝子を欠いている、提供することと、（b）c e D N Aゲノムの産生を可能にする条件下で宿主細胞を培養することと、（c）細胞を採取し、当該細胞から産生されたA A Vゲノムを単離することと、を含み得る。

30

【0248】

c e D N Aプラスミドからc e D N Aベクターを作製する例示的な方法

一実施形態では、カプシド不含c e D N Aベクターを作製するための方法、特にインビボ実験に十分なベクターを提供するために十分に高い収率を有する方法もまた、本明細書に提供される。

40

【0249】

一実施形態では、c e D N Aベクターの産生方法は、（1）発現カセットおよび2つの対称I T R配列を含む核酸構築物を宿主細胞（例えば、S f 9細胞）中に導入するステップと、（2）任意に、例えば、プラスミド上に存在する選択マーカーを使用することによってクローン細胞株を確立するステップと、（3）R e pコード遺伝子を（当該遺伝子を担持するバキュロウイルスでのトランスフェクションまたは感染のいずれかによって）当該昆虫細胞中に導入するステップと、（4）細胞を採取し、c e D N Aベクターを精製するステップと、を含む。c e D N Aベクターの産生のために上記の発現カセットおよび2つのI T R配列を含む核酸構築物は、c e D N A－プラスミド、または下記のようにc e D N Aプラスミドで生成されたバクミドもしくはバキュロウイルスの形態であり得る。核

50

酸構築物は、トランスフェクション、ウイルス形質導入、安定した組み込み、または当該技術分野において既知の他の方法によって宿主細胞中に導入され得る。

【0250】

細胞株

一実施形態では、c e D N Aベクターの産生において使用される宿主細胞株は、S p o d o p t e r a f r u g i p e r d a (S f 9、S f 2 1 など) もしくはT r i c h o p l u s i a n i細胞に由来する昆虫細胞株、または他の無脊椎動物、脊椎動物、もしくは哺乳動物細胞を含む他の真核細胞株を含み得る。当業者に既知の他の細胞株、例えば、H E K 2 9 3、H u h - 7、H e L a、H e p G 2、H e p L A、9 1 1、C H O、C O S、M e W o、N I H 3 T 3、A 5 4 9、H T 1 1 8 0、単球、ならびに成熟および未成熟樹状細胞を使用することもできる。宿主細胞株は、高収率のc e D N Aベクター産生のために、c e D N A - プラスミドの安定した発現のためにトランスフェクトされ得る。

10

【0251】

一実施形態では、c e D N A - プラスミドは、当該技術分野において既知の試薬（例えば、リポソーム、リン酸カルシウム）または物理的手段（例えば、エレクトロポレーション）を使用し、一時的なトランスフェクションによってS f 9細胞中に導入され得る。代替的に、c e D N A - プラスミドをそれらのゲノム中に安定して組み込んでいる安定したS f 9細胞株が確立され得る。そのような安定した細胞株は、選択マーカーを上記のc e D N A - プラスミド中に組み込むことによって確立され得る。細胞株をトランスフェクションするために使用されるc e D N A - プラスミドが、抗生物質などの選択マーカーを含む場合、c e D N A - プラスミドでトランスフェクションされ、c e D N A - プラスミドD N Aをそれらのゲノム中に組み込んでいる細胞は、細胞増殖培地への抗生物質の添加によって選択され得る。次いで、細胞の耐性クローンは、単一細胞希釈またはコロニー移動技法によって単離され、伝播され得る。

20

【0252】

c e D N Aベクターの単離および精製

c e D N Aベクターを取得および単離するためのプロセスの例（例えば、遺伝子編集）は、2018年12月6日に出願された国際出願第2018/064242号の図4A〜4Eに記載されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一実施形態では、c e D N A - ベクターは、A A V R e pタンパク質を発現するプロデューサー細胞から得られ、c e D N A - プラスミド、c e D N A - バクミド、またはc e D N A - バキュロウイルスでさらに形質転換され得る。c e D N Aベクターの産生に有用なプラスミドとしては、国際出願第2018/064242号の図6A（R e p B I I C産生に有用な）、図6B（c e D N Aベクターを取得するために使用されるプラスミド）に示されるプラスミドが挙げられる。

30

【0253】

一実施形態では、ポリヌクレオチドは、プラスミド（R e p - プラスミド）、バクミド（R e p - バクミド）、またはバキュロウイルス（R e p - バキュロウイルス）中のプロデューサー細胞に送達されたA A V R e pタンパク質（R e p 7 8または6 8）をコードする。R e p - プラスミド、R e p - バクミド、およびR e p - バキュロウイルスは、上記の方法によって生成され得る。

40

【0254】

例示的なc e D N Aベクターである、c e D N Aベクターを産生するための方法は、本明細書に記載される。本発明のc e D N Aベクターを生成するために使用される発現構築物は、プラスミド（例えば、c e D N A - プラスミド）、バクミド（例えば、c e D N A - バクミド）、および／またはバキュロウイルス（例えば、c e D N A - バキュロウイルス）であり得る。単なる例として、c e D N Aベクターは、c e D N A - バキュロウイルスおよびR e p - バキュロウイルスに共感染した細胞から生成され得る。R e p - バキュロウイルスから産生されたR e pタンパク質は、c e D N A - バキュロウイルスを複製し

50

て、c e D N Aベクターを生成する。代替として、c e D N Aベクターは、R e p プラスミド、R e p バクミド、またはR e p バキュロウイルス中で送達されるA A V R e p タンパク質 (R e p 7 8 / 5 2) をコードする配列を含む構築物で安定してトランスフェクトされた細胞から生成され得る。c e D N A バキュロウイルスは、細胞に一時的にトランスフェクトされ、R e p タンパク質によって複製され、c e D N Aベクターを産生し得る。

【0255】

バクミド (例えば、c e D N A バクミド) は、S f 9、S f 2 l、T n i (T r i c h o p l u s i a n i) 細胞、H i g h F i v e細胞などの許容昆虫細胞中にトランスフェクションされ得、対称I T Rおよび発現カセットを含む配列を含む組換えバキュロウイルスである、c e D N A バキュロウイルスを生成し得る。c e D N A バキュロウイルスを昆虫細胞中に再度感染させて、次世代の組換えバキュロウイルスを取得することができる。任意選択的に、このステップを一回または複数回繰り返して、より多い量の組換えバキュロウイルスを産生することができる。

【0256】

本明細書に記載されるc e D N Aベクターを細胞から採取および収集するための時間は、c e D N Aベクターの高収率産生を達成するために選択され、最適化され得る。例えば、採取時間は、細胞生存率、細胞形態、細胞増殖などを考慮して選択され得る。通常、細胞は、c e D N Aベクター (例えば、c e D N Aベクター) を産生するためのバキュロウイルス感染から十分な時間が経過した後、但し細胞の大半がウイルスの毒性のために死滅し始める前に採取され得る。c e D N Aベクターは、Q i a g e n E N D O - F R E E P L A S M I D (登録商標) キットなどのプラスミド精製キットを使用して、S f 9細胞から単離され得る。プラスミド単離のために開発された他の方法もまた、c e D N Aベクターに対して適合され得る。一般に、任意の当該技術分野において既知の核酸精製方法、ならびに市販のDNA抽出キットが採用され得る。

【0257】

代替的に、細胞ペレットをアルカリ溶解プロセスに供し、得られた溶解物を遠心分離し、クロマトグラフィー分離を実施することによって、精製が実装され得る。1つの非限定例として、このプロセスは、核酸を保持するイオン交換カラム (例えば、S A R T O B I N D Q (登録商標)) 上に上澄をロードし、次いで溶出し (例えば、1.2 M N a C l 溶液で)、ゲル濾過カラム (例えば、6 高速流G E) 上でさらなるクロマトグラフィー精製を実施することによって実施され得る。次いで、カプシド不含A A Vベクターは、例えば、沈殿によって回収される。

【0258】

一実施形態では、c e D N Aベクターはまた、エキソソームまたは微粒子の形態で精製され得る。多くの細胞型が、膜微小胞の脱落を介して、可溶性タンパク質だけでなく、複合タンパク質／核酸カーゴも放出することは、当該技術分野において既知である (C o c u c c i e t a l, 2009, E P 1 0 3 0 6 2 2 6. 1)。そのような小胞は、微小胞 (微粒子とも称される) およびエキソソーム (ナノ小胞とも称される) を含み、それらの両方が、タンパク質およびRNAをカーゴとして含む。微小胞は、形質膜の直接出芽から生成され、エキソソームは、多小胞エンドソームと形質膜との融合時に細胞外環境に放出される。したがって、c e D N Aベクターを含有する微小胞および／またはエキソソームは、c e D N Aプラスミド、またはc e D N Aプラスミドで生成されたバクミドもしくはバキュロウイルスで形質導入された細胞から単離され得る。

【0259】

一実施形態では、微小胞は、培養培地を20,000×gでの濾過または超遠心分離、および100,000×gでのエキソソームにかけることによって単離され得る。超遠心分離の最適な期間は、実験的に決定することができ、小胞が単離される特定の細胞型に依存するであろう。好ましくは、培養培地は、最初に低速遠心分離 (例えば、2000×gで5～20分間) によって一掃され、例えば、A M I C O N (登録商標) スピнкаラム (

10

20

30

40

50

Millipore, Watford, UK) を使用し、スピン濃度に供される。微小胞およびエキソソームは、微小胞およびエキソソーム上に存在する特定の表面抗原を認識する特定の抗体を使用することによって、FACSまたはMACSを介してさらに精製され得る。他の微小胞およびエキソソーム精製方法としては、免疫沈殿、親和性クロマトグラフィー、濾過、および特定の抗体またはアプタマーでコーティングされた磁気ビーズが挙げられるが、これらに限定されない。精製時に、小胞を、例えば、リン酸緩衝生理食塩水で洗浄する。ceDNA含有小胞を送達するために微小胞またはエキソソームを使用する1つの利点は、これらの小胞が、それぞれの細胞型上の特定の受容体によって認識されるそれらの膜タンパク質上に含めることによって、様々な細胞型に標的化され得ることである。(EP10306226も参照)、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

【0260】

本発明の別の態様は、ceDNA構築物をそれら自体のゲノム中に安定して組み込んでいる宿主細胞株からceDNAベクターを精製する方法に関する。一実施形態では、ceDNAベクターは、DNA分子として精製される。別の実施形態では、ceDNAベクターは、エキソソームまたは微粒子として精製される。

【0261】

PCT/US18/49996の図5は、実施例に記載される方法を使用して、複数のceDNAプラスミド構築物からceDNAの産生を確認するゲルを示す。

【0262】

VI. 脂質粒子の調製

20

脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)は、ceDNAおよび脂質の混合時に自発的に形成することができる。所望の粒子サイズ分布に応じて、得られたナノ粒子混合物は、例えば、Lipex Extruder(Northern Lipids, Inc)などのサーモバレル押出機を使用して、膜(例えば、100nmカットオフ)を通して押し出すことができる。場合によっては、押し出しステップは省略することができる。エタノール除去および同時緩衝液交換は、例えば、透析またはタンジェンシャル・フロー・フィルトレーションによって達成され得る。一実施形態では、脂質ナノ粒子は、本明細書の実施例6に記載されているように形成される。

【0263】

一般に、脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)は、当該技術分野において既知の任意の方法によって形成することができる。例えば、脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)は、例えば、US2013/0037977、US2010/0015218、US2013/0156845、US2013/0164400、US2012/0225129およびUS2010/0130588に記載されている方法によって調製することができ、これらの各々の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。いくつかの実施形態では、脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)は、連続混合法、直接希釈プロセス、またはインライン希釈プロセスを使用して調製することができる。直接希釈およびインライン希釈プロセスを使用して脂質ナノ粒子を調製するための装置のプロセスおよび装置は、US2007/0042031に記載されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。段階希釈プロセスを使用して脂質ナノ粒子を調製するためのプロセスおよび装置は、US2004/0142025に記載されており、その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

30

40

【0264】

一実施形態では、脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)は、衝突ジェットプロセスによって調製することができる。一般に、粒子は、アルコール(例えば、エタノール)に溶解した脂質を、緩衝液、例えば、クエン酸緩衝液、酢酸ナトリウム緩衝液、酢酸ナトリウムおよび塩化マグネシウム緩衝液、リンゴ酸緩衝液、リンゴ酸および塩化ナトリウム緩衝液、またはクエン酸ナトリウムおよび塩化ナトリウム緩衝液、に溶解したceDNAと混合することによって形成される。ceDNAに対する脂質の混合比は、約45~55%の脂質および約65~45%のceDNAであり得る。

50

【0265】

脂質溶液は、アルコール、例えばエタノール中に、5～30mg/mL、よりおそらく5～15mg/mL、最もおそらく9～12mg/mLの全脂質濃度で、カチオン性脂質（例えば、イオン化可能なカチオン性脂質）、非カチオン性脂質（例えば、DSPC、DOPE、およびDOPCなどのリン脂質）、PEGまたはPEGコンジュゲートされた分子（例えば、PEG-脂質）、およびステロール（例えば、コレステロール）を含有することができる。脂質溶液において、脂質のモル比は、カチオン性脂質の場合、約25～98%、好ましくは約35～65%、非イオン性脂質の場合、約0～15%、好ましくは約0～12%、PEGまたはPEGコンジュゲートされた脂質分子の場合、約0～15%、好ましくは約1～6%、ステロールの場合、約0～75%、好ましくは約30～50%の範囲であり得る。

10

【0266】

ceDNA溶液は、3.5～5の範囲のpHを有する、緩衝溶液中に0.3～1.0mg/mL、好ましくは、0.3～0.9mg/mLの濃度範囲でceDNAを含むことができる。

【0267】

LNPを形成するために、1つの例示的であるが非限定的な実施形態では、2つの液体は、約15～40℃、好ましくは約30～40℃の範囲の温度に加熱され、次いで、例えば、衝突ジェットミキサーにおいて混合され、即座にLNPを形成する。混合流速は、10～600mL/分の範囲であり得る。チューブIDの範囲は、0.25～1.0mm、総流速は、10～600mL/分を有することができる。流速およびチューブIDの組み合わせは、LNPの粒子サイズを30～200nmに制御する効果を有することができる。次いで、溶液を、より高いpHで、1:1～1:3のvol:vol、好ましくは約1:2のvol:volの範囲の混合比で緩衝溶液と混合することができる。必要に応じて、この緩衝溶液は、15～40℃または30～40℃の範囲の温度になり得る。次いで、混合されたLNPは、アニオン交換濾過ステップを受けることができる。アニオン交換の前に、混合されたLNPを一定期間、例えば30分～2時間インキュベートすることができる。インキュベーション中の温度は、15～40℃または30～40℃の範囲の温度になり得る。インキュベーション後、アニオン交換分離ステップを含む0.8μmフィルターなどのフィルターで溶液を濾過する。このプロセスでは、1mmのID～5mmのIDの範囲のチューブIDおよび10～2000mL/分の流速を使用できる。

20

30

【0268】

形成後、LNPを濃縮し、限外濾過プロセスを介して限界濾過することができ、このプロセスでは、アルコールが除去され、緩衝液が最終的な緩衝溶液、例えば、約pH7、例えば約pH6.9、約pH7.0、約pH7.1、約pH7.2、約pH7.3、または約pH7.4のリン酸緩衝生理食塩水（PBS）と交換される。

【0269】

限外濾過プロセスでは、膜の公称分子量カットオフ範囲が30～500kDのタンジェンシャル・フロー・フィルトレーションフォーマット（TFF）を使用できる。膜フォーマットは中空糸またはフラットシートカセットである。適切な分子量カットオフのTFFプロセスでは、保持液にLNPを保持することができ、濾液または透過液はアルコール、クエン酸緩衝液および最終緩衝液の廃棄物を含有する。TFFプロセスは、初期濃度が1～3mg/mLのceDNA濃度になる複数ステップのプロセスである。濃縮後、LNP溶液を最終緩衝液に対して10～20容量で限界濾過し、アルコールを除去して緩衝液交換を実施する。次いで、材料をさらに1～3倍に濃縮することができる。濃縮されたLNP溶液は滅菌濾過できる。

40

【0270】

VII. 薬学的組成物および製剤

本明細書では、ceDNA脂質粒子および薬学的に許容される担体または賦形剤を含む薬学的組成物もまた提供される。

50

【0271】

一実施形態では、c e DNA 脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、治療用核酸の完全な封入、部分的な封入とともに提供される。一実施形態では、核酸治療薬は、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）に完全に封入されて、脂質粒子を含有する核酸を形成する。一実施形態では、核酸は、粒子の脂質部分内に封入され得、それによって、それを酵素分解から保護し得る。

【0272】

一実施形態では、脂質粒子は、効果的な送達を保证するため、約20 nm～約100 nm、30 nm～約150 nm、約40 nm～約150 nm、約50 nm～約150 nm、約60 nm～約130 nm、約70 nm～約110 nm、約70 nm～約100 nm、約80 nm～約100 nm、約90 nm～約100 nm、約70～約90 nm、約80 nm～約90 nm、約70 nm～約80 nm、または約75 nm、80 nm、85 nm、90 nm、95 nm、100 nm、105 nm、110 nm、115 nm、120 nm、125 nm、130 nm、135 nm、140 nm、145 nmもしくは150 nmの平均直径を有する。核酸含有脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）およびそれらの調製方法は、例えば、PCT/US18/50042、米国特許公開第2004/0142025号および同第2007/0042031号に開示されており、これらの開示は、あらゆる目的のために参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。一実施形態では、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）サイズは、例えば、Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) システムを使用して準弾性光散乱によって決定することができる。

【0273】

一般に、本発明の脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、意図した治療効果を提供するように選択された平均直径を有する。

【0274】

脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）の意図した使用に応じて、構成成分の割合は変化し得、特定の製剤の送達効率、例えば、エンドソーム放出パラメーター（ERP）アッセイを使用して測定され得る。

【0275】

一実施形態では、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、凝集を防止するために他の部分とコンジュゲートされ得る。そのような脂質コンジュゲートには、例えば、ジアルキルオキシプロピルと共役したPEG（例えば、PEG-DAAコンジュゲート）、ジアシルグリセロールと共役したPEG（例えば、PEG-DAGコンジュゲート）、コレステロールと共役したPEG、ホスファチジルエタノールアミンと共役したPEG、およびセラミドとコンジュゲートしたPEG（例えば、米国特許第5,885,613号を参照されたい）などのPEG-脂質コンジュゲート、カチオン性PEG脂質、ポリオキサゾリン（POZ）-脂質コンジュゲート（例えば、POZ-DAAコンジュゲート、例えば、2010年1月13日に出版された米国仮出願第61/294,828号、および2010年1月14日に出版された米国仮出願第61/295,140号を参照されたい）、ポリアミドオリゴマー（例えば、ATTA-脂質コンジュゲート）ならびにそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。POZ-脂質コンジュゲートの追加例は、PCT公開第2010/006282号に記載されている。PEGまたはPOZは、脂質に直接コンジュゲートすることができるか、リンカー部分を介して脂質に連結することができる。例えば、非エステル含有リンカー部分およびエステル含有リンカー部分を含む、PEGまたはPOZを脂質に共役するのに好適な任意のリンカー部分を使用することができる。ある特定の好ましい実施形態では、アミドまたはカルバメートなどの非エステル含有リンカー部分が使用される。上記の各特許文書の開示内容は、あらゆる目的で参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0276】

一実施形態では、c e DNA は、粒子の脂質部分と複合され得るか、または脂質粒子（

例えば、脂質ナノ粒子)の脂質位置に封入され得る。一実施形態では、ceDNAは、脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)の脂質位置に完全に封入され得、それによって例えば水溶液中のヌクレアーゼによる分解からそれを保護する。一実施形態では、脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)中のceDNAは、37℃で少なくとも約20、30、45、または60分間のヌクレアーゼへの脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)の曝露後に実質的に分解されない。いくつかの実施形態では、脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)中のceDNAは、37℃で少なくとも約30、45、もしくは60分、または少なくとも約2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、もしくは36時間の血清中の粒子のインキュベーション後に実質的に分解されない。

【0277】

一実施形態では、脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)は、対象、例えばヒトなどの哺乳動物に対して実質的に非毒性である。

【0278】

一実施形態では、本開示の治療用核酸を含む薬学的組成物は、脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)に製剤化され得る。いくつかの実施形態では、治療用核酸を含む脂質粒子は、カチオン性脂質から形成することができる。いくつかの他の実施形態では、治療用核酸を含む脂質粒子は、非カチオン性脂質から形成され得る。好ましい実施形態では、本発明の脂質粒子は、核酸を含有する脂質粒子であり、これは、mRNA、アンチセンスRNAおよびオリゴヌクレオチド、リボザイム、アプタマー、干渉RNA(RNAi)、ダイサー基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA(shRNA)、非対称干渉RNA(aiRNA)、マイクロRNA(miRNA)、ミニサークルDNA、ミニ遺伝子、ウイルス性DNA(例えば、レンチウイルスまたはAAVゲノム)または非ウイルス性合成DNAベクター、閉端直鎖状二重鎖DNA(ceDNA/CELID)、プラスミド、バクミド、doggybone(商標)DNAベクター、最小限の免疫学的に定義された遺伝子発現(MIDGE)ベクター、非ウイルス性ミニストリングDNAベクター(直鎖状共有結合性閉鎖DNAベクター)、またはダンベル型DNA最小ベクター(「ダンベルDNA」)からなる群から選択される治療用核酸を含むカチオン性脂質から形成される。

【0279】

別の好ましい実施形態では、本発明の脂質粒子は核酸含有脂質粒子であり、これは非カチオン性脂質、および任意選択的に粒子の凝集を防止するコンジュゲートされた脂質から形成される。

【0280】

一実施形態では、脂質粒子製剤は、水溶液である。一実施形態では、脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)製剤は、凍結乾燥粉末である。

【0281】

いくつかの態様によれば、本開示は、1つ以上の薬学的賦形剤をさらに含む脂質粒子製剤を提供する。一実施形態では、脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)製剤は、スクロース、トリス、トレハロース、および/またはグリシンをさらに含む。

【0282】

一実施形態では、本明細書に開示される脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)は、対象の細胞、組織、または器官へのインビボ送達のために対象に投与するのに好適な薬学的組成物に組み込まれ得る。典型的に、薬学的組成物は、本明細書に開示されるceDNA脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)および薬学的に許容される担体を含む。一実施形態では、本開示のceDNA脂質粒子(例えば、脂質ナノ粒子)は、治療的投与(例えば、非経口投与)の所望の経路に適した薬学的組成物に組み込むことができる。高圧静脈内または動脈内注入を介した受動組織形質導入、同様に、核内微量注射もしくは細胞質内注射などの細胞内注射もまた、企図される。治療目的のための薬学的組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高ceDNAベクター濃度に好適な他の秩序構造として製剤化され得る。無菌の注射可能な溶液は、適切な緩衝液中の必要量のceDNA

10

20

30

40

50

ベクター化合物を、必要に応じて、上記で列挙した成分のうちの1つまたは組み合わせと組み込み、濾過滅菌によって調製され得る。

【0283】

本明細書に開示される脂質粒子は、局所、全身、羊膜内、くも膜下腔内、頭蓋内、動脈内、静脈内、リンパ内、腹腔内、皮下、気管、組織内（例えば、筋肉内、心臓内、肝内、腎臓内、脳内）、くも膜下腔内、膀胱内、結膜（例えば、眼窩外、眼窩内、眼窩後、網膜内、網膜下、脈絡膜、脈絡膜下、間質内、房内、および硝子体内）、蝸牛内、ならびに粘膜（例えば、経口、直腸、経鼻）投与に好適な薬学的組成物に組み込むことができる。高圧静脈内または動脈内注入を介した受動組織形質導入、同様に、核内微量注射もしくは細胞質内注射などの細胞内注射もまた、企図される。

10

【0284】

c e D N A 脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）を含む薬学的に活性な組成物は、核酸中の導入遺伝子をレシピエントの細胞に送達するように製剤化され得、その中の導入遺伝子の治療的発現をもたらす。この組成物はまた、薬学的に許容される担体を含み得る。

【0285】

治療目的のための薬学的組成物は、典型的に、無菌であり、製造および保存の条件下で安定していなければならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、分散液、リポソーム、または高 c e D N A ベクター濃度に好適な他の秩序構造として製剤化され得る。無菌の注射可能な溶液は、適切な緩衝液中の必要量の c e D N A ベクター化合物を、必要に応じて、上記で列挙した成分のうちの1つまたは組み合わせと組み込み、濾過滅菌によって調製され得る。

20

【0286】

一実施形態では、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、少なくとも1つの脂質二層を有する固体コア粒子である。一実施形態では、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、非二層構造、すなわち非ラメラ（すなわち、非二層）形態を有する。無制限に、非二層形態としては、例えば、三次元チューブ、棒、立方対称性などを挙げることができる。脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）の非ラメラ形態（すなわち、非二層構造）は、当業者に既知であり、当業者によって使用される分析技法を使用して決定され得る。そのような技法としては、低温透過型電子顕微鏡（「C r y o - T E M」）、示差走査熱量計（「D S C」）、X線回折などが挙げられるが、これらに限定されない。例えば、脂質粒子の形態（ラメラ対非ラメラ）は、容易に評価され、U S 2 0 1 0 / 0 1 3 0 5 8 8（その内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる）に記載される C r y o - T E M 分析を使用して容易に評価され、特性化され得る。

30

【0287】

一実施形態では、非ラメラ形態を有する脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、高電子密度である。

【0288】

一実施形態では、本開示は、単一ラメラ構造または多ラメラ構造のいずれかである脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）を提供する。いくつかの態様では、本開示は、多胞体粒子および／または発泡ベース粒子を含む脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）製剤を提供する。脂質構成成分の組成物および濃度を制御することによって、脂質コンジュゲートが脂質粒子（脂質ナノ粒子）外で交換する速度、順に脂質ナノ粒子が膜融合性になる速度を制御することができる。加えて、例えば、p H、温度、またはイオン強度を含む他の変数を使用して、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）が膜融合性になる速度を変化および／または制御することができる。脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）が膜融合性になる速度を制御するために使用され得る他の方法は、本開示に基づいて当業者に明らかとなるであろう。脂質コンジュゲートの組成物および濃度を制御することによって、脂質粒子サイズを制御することができることも明らかとなるであろう。

40

【0289】

一実施形態では、製剤化されたカチオン性脂質の p K a は、核酸の送達のための L N P

50

の有効性と相関し得る (Jayaraman et al, Angewandte Chemie, International Edition (2012), 51 (34), 8529-8533、Semple et al, Nature Biotechnology 28, 172-176 (2010) を参照。それらの両方は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる)。一実施形態では、 pK_a の好ましい範囲は、約5～約7である。一実施形態では、カチオン性脂質の pK_a は、2-(p-トリルイジノ)-6-ナフタレンスルホン酸 (TNS) の蛍光に基づくアッセイを使用し、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) 中で決定され得る。

【0290】

一実施形態では、脂質粒子 (例えば、脂質ナノ粒子) 中の $ceDNA$ の封入は、核酸と会合したときに蛍光を強化した色素を使用する、膜不透過性蛍光色素排除アッセイ、例えば *Oligreen* (登録商標) アッセイまたは *PicoGreen* (登録商標) アッセイを実施することによって決定され得る。一般に、封入は、脂質粒子製剤に色素を添加し、得られた蛍光を測定し、それを少量の非イオン性界面活性剤の添加時に観察される蛍光と比較することによって決定される。脂質二層の界面活性剤媒介性崩壊は、封入された $ceDNA$ を放出し、それが膜不透過性色素と相互作用することを可能にする。 $ceDNA$ の封入は、 $E = (I_o - I) / I_o$ として計算することができ、 I および I_o は、界面活性剤の添加前および添加後の蛍光強度を指す。

【0291】

単位投与量

一実施形態では、薬学的組成物は、単位剤形で提示され得る。単位剤形は、典型的に、薬学的組成物の1つ以上の投与経路に適合されるであろう。いくつかの実施形態では、単位剤形は、吸入による投与に適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、吸入器による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、噴霧器による投与に適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、エアロゾル化器による投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、経口投与のため、頬側投与のため、または舌下投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、静脈内、筋肉内、または皮下投与のために適合される。いくつかの実施形態では、単位剤形は、髄腔内または脳室内投与のために適合される。いくつかの実施形態では、薬学的組成物は、局所投与のために製剤化される。単一剤形を産生するために担体材料と組み合わせられ得る活性成分の量は、一般に、治療効果をもたらす化合物の量となるであろう。

【0292】

VIII. 治療の方法

本明細書に記載される $ceDNA$ ベクター (例えば、本明細書に記載の $ceDNA$ ベクター脂質粒子) および組成物を使用して、宿主細胞に核酸配列 (例えば、治療用核酸配列) を導入することができる。一実施形態では、 $ceDNA$ ベクター (例えば、本明細書に記載される $ceDNA$ ベクター脂質粒子) を使用する宿主細胞への核酸配列の導入を、治療された患者からの適切なバイオマーカーでモニタリングして、遺伝子発現を評価することができる。

【0293】

本明細書に提供される組成物およびベクターを使用して、様々な目的のために導入遺伝子 (核酸配列) を送達することができる。一実施形態では、 $ceDNA$ ベクター (例えば、本明細書に記載される $ceDNA$ ベクター脂質粒子) は、例えば、エクスサイチュ、インビトロおよびインビボの適用、方法論、診断手順、および／または遺伝子療法レジメンを含む、様々な方法で使用することができる。

【0294】

本明細書で提供されるのは、治療有効量の $ceDNA$ ベクター (例えば、本明細書に記載される $ceDNA$ ベクター脂質粒子) を、任意選択的に薬学的に許容される担体とともに、治療を必要とする対象の標的細胞 (例えば、筋細胞もしくは組織、または他の罹患した細胞型) に導入することを含む、対象における疾患または障害を治療する方法である。

c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）は、担体の存在下で導入され得るが、このような担体は必要とされない。実装されるc e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）は、疾患を治療するために有用な目的のヌクレオチド配列を含む。特に、c e D N Aベクターは、対象に導入されたときに、外因性D N A配列によってコードされる所望のポリペプチド、タンパク質、またはオリゴヌクレオチドの転写を指示することができる制御エレメントに操作可能に連結された所望の外因性D N A配列を含み得る。c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載のc e D N Aベクター脂質粒子）は、本明細書に記載され、当該技術分野において既知の任意の適切な経路を介して投与することができる。一実施形態では、標的細胞は、ヒト対象にある。

10

【0295】

本明細書で提供されるのは、診断的または治療的に有効な量のc e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）を、それを必要とする対象に提供するための方法であり、この方法は、ある量のc e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）を、それを必要とする対象の細胞、組織、または器官に、c e D N Aベクターからの導入遺伝子の発現を可能にするのに有効な時間にわたって提供し、それによって診断的または治療的に有効な量のc e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）によって発現されるタンパク質、ペプチド、核酸を、対象に提供することを含む。一実施形態では、対象は、ヒトである。

20

【0296】

本明細書で提供されるのは、対象における疾患、障害、機能不全、傷害、異常状態、または外傷のうちの少なくとも1つ以上の症状を診断、予防、治療、または改善するための方法である。一般に、この方法は、1つ以上のc e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）を、それを必要とする対象に、対象の疾患、障害、機能不全、傷害、異常状態、または外傷の1つ以上の症状を診断、予防、治療、または改善するのに十分な量および時間にわたって投与するステップを少なくとも含む。一実施形態では、対象は、ヒトである。

【0297】

本明細書で提供されるのは、疾患または疾患状態の1つ以上の症状を治療または低減するためのツールとしての、c e D N Aベクターを使用することを含む方法である。欠陥遺伝子が知られているいくつかの遺伝性疾患が存在し、典型的に、通常は一般に劣性的に遺伝される酵素の欠乏状態と、調節または構造タンパク質に関与し得るが、典型的に常に優性的に遺伝されるとは限らない不均衡状態との2つのクラスに分類される。欠乏状態の疾患の場合、c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）を使用し、導入遺伝子を送達して、置換療法のために正常な遺伝子を罹患した組織に運び入れるとともに、いくつかの実施形態では、アンチセンス変異を使用して、疾患の動物モデルを創り出すことができる。不均衡疾患状態の場合、c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）を使用して、モデルシステムにおいて疾患状態を創り出すことができ、次いでこれを使用して、その疾患状態に反作用するように試みることができる。したがって、本明細書に開示されるc e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）および方法は、遺伝子疾患の治療を可能にする。本明細書で使用される場合、疾患状態は、疾患を引き起こす、またはそれをより重篤にする欠乏または不均衡を部分的または全体的に修繕することによって治療される。

30

40

【0298】

一般に、上記の説明に従ってc e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）を使用して任意の導入遺伝子を送達して、遺伝子発現に関する任意の障害に関連する症状を治療、予防、または改善することができる。例示的な疾患状態としては、嚢胞性線維症（および他の肺の疾患）、血友病A、血友病B、サラセミア、

50

貧血症および他の血液障害、AIDS、アルツハイマー病、パーキンソン病、ハンチントン病、筋萎縮性側索硬化症、癲癇および他の神経障害、がん、糖尿病、筋ジストロフィー（例えば、デュシェンヌ型、ベッカー型）、ハーラー病、アデノシンデアミナーゼ欠損症、代謝障害、網膜変性疾患（および他の眼の疾患）、ミトコンドリオパチー（例えば、レーベル遺伝性視神経症（LHON）、リー症候群、および亜急性硬化性脳炎）、ミオパチー（例えば、顔面肩甲上腕型ミオパチー（FSHD）および心筋症）、固形臓器（例えば、脳、肝臓、腎臓、心臓）の疾患等が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、本明細書に開示されるようなc e DNAベクターは、代謝障害（例えば、オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症）を有する個人の治療において有利に使用され得る。

10

【0299】

一実施形態では、本明細書に記載されるc e DNAベクターを使用して、遺伝子または遺伝子産物中の変異によって引き起こされる疾患または障害を治療、改善、および／または予防することができる。c e DNAベクター（例えば、本明細書に記載のc e DNAベクター脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子））で治療され得る例示的な疾患または障害としては、代謝疾患または障害（例えば、ファブリー病、ゴーシェ病、フェニルケトン尿症（PKU）、グリコーゲン蓄積疾患）；尿素サイクル疾患または障害（例えば、オルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠損症）；リソソーム蓄積疾患または障害（例えば、異染性白質ジストロフィー（MLD）、ムコ多糖症II型（MPS II、ハンター症候群））；肝疾患または障害（例えば、進行性家族性肝内胆汁うっ滞（PFIC））；血液疾患または障害（例えば、血友病（AおよびB）、サラセミア、および貧血症）；がんおよび腫瘍、ならびに遺伝子疾患または障害（例えば、嚢胞性線維症）が挙げられるが、これらに限定されない。

20

【0300】

一実施形態では、c e DNAベクター（例えば、本明細書に記載されるc e DNAベクター脂質粒子）を用いて、導入遺伝子（例えば、本明細書に記載される、ホルモンまたは増殖因子をコードする導入遺伝子）の発現レベルを調節することが望ましい状況において、異種ヌクレオチド配列を送達することができる。

【0301】

一実施形態では、c e DNAベクター（例えば、本明細書に記載されるc e DNAベクター脂質粒子）を使用して、疾患または障害をもたらす遺伝子産物の異常なレベルおよび／または機能（例えば、タンパク質中の不在または欠損）を訂正することができる。c e DNAベクター（例えば、本明細書に記載されるc e DNAベクター脂質粒子）は、機能的タンパク質を産生し、かつ／またはタンパク質のレベルを修正して、タンパク質中の不在もしくは欠損によって引き起こされる特定の疾患もしくは障害から生じる症状を緩和もしくは低減するか、または利益を付与することができる。例えば、OTC欠損症の治療は、機能的OTC酵素を産生することによって達成され得る。血友病AおよびBの治療は、第VII因子、第IX因子、および第X因子のレベルを修正することによって達成され得る。PKUの治療は、フェニルアラニンヒドロキシラーゼ酵素のレベルを修正することによって達成され得る。ファブリー病またはゴーシェ病の治療は、それぞれ機能的αガラクトシダーゼまたはβグルコセレブロシダーゼを産生することによって達成され得る。MFDまたはMPS IIの治療は、それぞれ機能的アリアルスルファターゼAまたはイズロネート-2-スルファターゼを産生することによって達成され得る。嚢胞性線維症の治療は、機能的嚢胞性線維症の膜貫通コンダクタンス調節剤を産生することによって達成され得る。グリコーゲン蓄積疾患の治療は、機能的G6Pase酵素機能を回復することによって達成され得る。PFICの治療は、機能的ATP8B1、ATP8B1、ATP8B4、またはTJP2遺伝子を産生することによって達成され得る。

30

40

【0302】

一実施形態では、c e DNAベクター（例えば、本明細書に記載のc e DNAベクター脂質粒子）を使用して、インビトロまたはインビボで細胞にRNAベースの治療薬を提供

50

することができる。RNAベースの治療剤の例としては、mRNA、アンチセンスRNAおよびオリゴヌクレオチド、リボザイム、アプタマー、干渉RNA (RNAi)、ダイサー基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、非対称干渉RNA (aiRNA)、マイクロRNA (miRNA)が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、一実施形態では、ceDNAベクター (例えば、本明細書に記載のceDNAベクター脂質粒子)を使用して、インビトロまたはインビボで細胞にアンチセンス核酸を提供することができる。例えば、導入遺伝子が、RNAi分子である場合、標的細胞中のアンチセンス核酸またはRNAiの発現は、細胞による特定のタンパク質の発現を減少させる。したがって、RNAi分子またはアンチセンス核酸である導入遺伝子を投与して、それを必要とする対象における特定のタンパク質の発現を減少させることができる。アンチセンス核酸をインビトロで細胞に投与して、細胞生理学を調節する、例えば、細胞または組織培養系を最適化することもできる。

10

【0303】

一実施形態では、ceDNAベクター (例えば、本明細書に記載のceDNAベクター脂質粒子)を使用して、インビトロまたはインビボで細胞にDNAベースの治療薬を提供することができる。DNAベースの治療剤の例としては、ミニサークルDNA、ミニ遺伝子、ウイルスDNA (例えば、レンチウイルスまたはAAVゲノム) または非ウイルス合成DNAベクター、閉端直鎖状二本鎖DNA (ceDNA/CELID)、プラスミド、バクミド、doggybone (商標) DNAベクター、最小限の免疫学的に定義された遺伝子発現 (MIDGE) ベクター、非ウイルスミニストリングDNAベクター (直鎖状の共有結合的に閉じたDNAベクター)、またはダンベル型DNA最小ベクター (「ダンベルDNA」) が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、一実施形態では、ceDNAベクター (例えば、本明細書に記載のceDNAベクター脂質粒子)を使用して、インビトロまたはインビボで細胞にミニサークルを提供することができる。例えば、導入遺伝子が、ミニサークルDNAである場合、標的細胞中のミニサークルDNAの発現は、細胞による特定のタンパク質の発現を減少させる。したがって、ミニサークルDNAである導入遺伝子を投与して、それを必要とする対象における特定のタンパク質の発現を減少させることができる。ミニサークルDNAをインビトロで細胞に投与して、細胞生理学を調節する、例えば、細胞または組織培養系を最適化することもできる。

20

【0304】

一実施形態では、ceDNAベクターによってコードされる例示的な導入遺伝子としては、X、リソソーム酵素 (例えば、タイ・サックス病に関連するヘキサミニダーゼA、またはハンター症候群/MPS IIに関連するイズロネートスルファターゼ)、エリスロポエチン、アンジオスタチン、エンドスタチン、スーパーオキシドジスムターゼ、グロビン、レプチン、カタラーゼ、チロシンヒドロキシラーゼ、ならびにサイトカイン (例えば、インターフェロン、b-インターフェロン、インターフェロン-g、インターロイキン-2、インターロイキン-4、インターロイキン12、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子、リンホトキシン等)、ペプチド増殖因子およびホルモン (例えば、ソマトトロピン、インスリン、インスリン様増殖因子1および2、血小板由来増殖因子 (PDGF)、上皮増殖因子 (EGF)、線維芽細胞増殖因子 (FGF)、神経増殖因子 (NGF)、神経栄養因子-3および4、脳由来神経栄養因子 (BDNF)、グリア由来増殖因子 (GDNF)、形質転換増殖因子-aおよび-bなど)、受容体 (例えば、腫瘍壊死因子受容体) が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの例示的な実施形態では、導入遺伝子は、1つ以上の所望の標的に特異的なモノクローナル抗体をコードする。いくつかの例示的な実施形態では、2つ以上の導入遺伝子が、ceDNAベクターによってコードされる。いくつかの例示的な実施形態では、導入遺伝子は、目的の2つの異なるポリペプチドを含む融合タンパク質をコードする。いくつかの実施形態では、導入遺伝子は、本明細書で定義されるように、全長抗体または抗体断片を含む、抗体をコードする。いくつかの実施形態では、抗体は、本明細書に定義されるように、抗原結合ドメインまたは免疫グロブリン可変ドメイン配列である。他の例示的な導入遺伝子配列は、自殺遺伝子産物 (チ

30

40

50

ミジンキナーゼ、シトシンデアミナーゼ、ジフテリア毒素、チトクローム P 4 5 0、デオキシシジンキナーゼ、および腫瘍壊死因子)、がん療法において使用される薬物に対する耐性を付与するタンパク質、および腫瘍抑制因子遺伝子産物をコードする。

【0305】

投与

一実施形態では、c e D N Aベクター(例えば、本明細書に記載のc e D N Aベクター脂質粒子)は、インビボでの細胞の形質導入のために生物に投与することができる。一実施形態では、c e D N Aベクター(例えば、本明細書に記載のc e D N Aベクター脂質粒子)は、エキスビボでの細胞の形質導入のために生物に投与することができる。

【0306】

一般に、投与は、分子を血液または組織細胞と最終的に接触させるために通常使用される経路のうちのいずれかによるものである。そのような核酸を投与する好適な方法は、当業者によって利用可能かつ周知であり、特定の組成物を投与するために2つ以上の経路が使用され得るが、特定の経路は、多くの場合、別の経路よりも即時であり、効果的な反応を提供し得る。c e D N Aベクター(例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子)の例示的な投与形態としては、経口、直腸、経粘膜、鼻腔内、吸入(例えば、エアロゾルを介した)、頬側(例えば、舌下)、膣、髄腔内、眼内、経皮、内皮内、子宮内(または卵内)、非経口(例えば、静脈内、皮下、皮内、頭蓋内、筋肉内(骨格、横隔膜、および/または心筋への投与を含む)、胸膜内、脳内、および動脈内)、局所(例えば、気道表面を含む皮膚および粘膜表面への、ならびに経皮投与)、リンパ内など、ならびに直接組織または器官注入(例えば、肝臓、眼、骨格筋、心筋、横隔膜、筋肉、もしくは脳への)が挙げられる。

【0307】

c e D N Aベクター(例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子)の投与は、脳、骨格筋、平滑筋、心臓、横隔膜、気道上皮、肝臓、腎臓、脾臓、膵臓、皮膚、および眼からなる群から選択される部位を含むが、これらに限定されない、対象の任意の部位に対して行われ得る。一実施形態では、c e D N Aベクター(例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子)の投与はまた、腫瘍(例えば、腫瘍またはリンパ節内またはその付近)に対するものであり得る。任意の所与の症例における最も好適な経路は、治療、改善、および/または予防される病態の性質および重症度、ならびに使用されている特定のc e D N Aベクター(例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子)の性質に依存するであろう。追加として、c e D N Aは、単一のベクターまたは複数のc e D N Aベクター(例えば、c e D N Aカクテル)中に2つ以上の導入遺伝子を投与することを可能にする。

【0308】

一実施形態では、c e D N Aベクター(例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子)の骨格筋への投与としては、肢(例えば、上腕、下腕、上肢、および/または下肢)、腰、首、頭(例えば、舌)、咽頭、腹部、骨盤/会陰、および/または指の骨格筋への投与が挙げられるが、これらに限定されない。c e D N Aベクター(例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子)は、静脈内投与、動脈内投与、腹腔内、四肢灌流(任意選択的に、脚および/もしくは腕の単離された四肢灌流、例えば、A r r u d a e t a l . , (2 0 0 5) B l o o d 1 0 5 : 3 4 5 8 - 3 4 6 4を参照されたい)ならびに/または直接筋肉内注射によって骨格筋に送達され得る。特定の実施形態では、c e D N Aベクター(例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子)は、対象(例えば、DMDなどの筋ジストロフィーを有する対象)の肢(腕および/または脚)に、四肢灌流、任意選択的に単離された四肢灌流(例えば、静脈内または動脈内投与による)によって投与される。一実施形態では、c e D N Aベクター(例えば、本明細書に記載のc e D N Aベクター脂質粒子)は、「流体力学的」技法を使用せずに投与することができる。

【0309】

10

20

30

40

50

c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）の心筋への投与としては、左心房、右心房、左心室、右心室、および／または中隔への投与が挙げられる。c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）は、静脈内投与、大動脈内投与などの動脈内投与、直接心臓注射（例えば、左心房、右心房、左心室、右心室への）、および／または冠動脈灌流によって心筋に送達され得る。横隔膜筋への投与は、静脈内投与、動脈内投与、および／または腹腔内投与を含む任意の好適な方法によって行われ得る。平滑筋への投与は、静脈内投与、動脈内投与、および／または腹腔内投与を含む任意の好適な方法によって行われ得る。一実施形態では、投与は、平滑筋内、その付近、および／またはその上に存在する内皮細胞に対して行われ得る。

10

【0310】

一実施形態では、c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載のc e D N Aベクター脂質粒子）は、骨格筋、横隔膜筋および／または心筋に投与される（例えば、筋ジストロフィーまたは心臓病を治療、改善、および／または予防するために（例えば、P A Dまたはうっ血性心不全））。

【0311】

c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載のc e D N Aベクター脂質粒子）は、C N S（例えば、脳または眼）に投与することができる。c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）は、脊髄、脳幹（延髄、脳橋）、中脳（視床下部、視床、視床上部、脳下垂体、黒質、松果体）、小脳、終脳（線条体、後頭葉、側頭葉、頭頂葉、および前頭葉、皮質、基底核、海馬、および扁桃体（p o r t a a m y g d a l a）を含む大脳）、辺縁系、新皮質、線条体、大脳、ならびに下丘中に導入されてもよい。c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子））はまた、網膜、角膜、および／または視神経などの眼の異なる領域に投与され得る。c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載のc e D N Aベクター脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子））は、（例えば、腰椎穿刺によって）脳脊髄液に送達され得る。c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子））は、さらに、血液脳関門が攪乱された状況（例えば、脳腫瘍または脳梗塞）において、C N Sに血管内投与され得る。

20

【0312】

一実施形態では、c e D N Aベクター（本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）は、当該技術分野において既知の任意の経路によってC N Sの所望の領域に投与され得、髄腔内、眼内、脳内、脳室内、静脈内（例えば、マンニトールなどの糖の存在下）、鼻腔内、耳内、眼内（例えば、硝子体内、網膜下、前房）、および眼周囲（例えば、テノン下領域）送達、ならびに運動ニューロンへの逆行性送達を伴う筋肉内送達を含むが、これらに限定されない。

30

【0313】

いくつかの実施形態では、c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）は、C N S中の所望の領域または区画への直接注入（例えば、定位的注入）によって、液体製剤中で投与される。他の実施形態によれば、c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）は、所望の領域への局所適用によって、またはエアロゾル製剤の鼻腔内投与によって提供され得る。眼への投与は、液滴の局所適用によって行われてもよい。さらなる代替例として、c e D N Aベクターは、固体の徐放性製剤として投与され得る（例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる米国特許第7, 201, 898号を参照されたい）。一実施形態では、c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）を、逆行性輸送に使用して、運動ニューロンが関与する疾患および障害（例えば、筋萎縮性側索硬化症（A L S）、脊髄性筋萎縮症（S M A）など）を治療、改善、および／または予防することができる。例えば、c e D N Aベクター（例えば、本明細書に記載されるc e D N Aベクター脂質粒子）は、筋組織に送達され、そこからニューロン中に移動し得る。

40

50

【0314】

一実施形態では、適切なレベルの発現が達成されるまで、治療用製品の反復投与を行うことができる。したがって、一実施形態では、治療用核酸を複数回投与および再投与することができる。例えば、治療用核酸は、0日目に投与することができる。0日目の初回治療に続いて、治療用核酸を用いた初回治療の約1週間、約2週間、約3週間、約4週間、約5週間、約6週間、約7週間、約8週間、または約3ヶ月、約4ヶ月、約5ヶ月、約6ヶ月、約7ヶ月、約8ヶ月、約9ヶ月、約10ヶ月、約11ヶ月、または約1年、約2年、約3年、約4年、約5年、約6年、約7年、約8年、約9年、約10年、約11年、約12年、約13年、約14年、約15年、約16年、約17年、約18年、約19年、約20年、約21年、約22年、約23年、約24年、約25年、約26年、約27年、約28年、約29年、約30年、約31年、約32年、約33年、約34年、約35年、約36年、約37年、約38年、約39年、約40年、約41年、約42年、約43年、約44年、約45年、約46年、約47年、約48年、約49年または約50年後に、2回目の投薬（再投薬）を実施することができる。

10

【0315】

一実施形態では、1つ以上の追加の化合物もまた含まれ得る。それらの化合物は、別々に投与され得るか、または追加の化合物は、本発明の脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）中に含まれ得る。言い換えれば、脂質粒子（例えば、脂質ナノ粒子）は、ceDNAに加えて他の化合物、または少なくとも第1のものとは異なる第2のceDNAを含有し得る。無制限に、他の追加の化合物は、小さいまたは大きい有機または無機分子、単糖類、二糖類、三糖類、オリゴ糖類、多糖類、ペプチド、タンパク質、ペプチド類似体およびそれらの誘導体、ペプチド模倣体、核酸、核酸類似体および誘導体、生体物質から作製される抽出物、またはそれらの任意の組み合わせからなる群から選択され得る。

20

【0316】

一実施形態では、1つ以上の追加の化合物は、治療剤であり得る。治療剤は、治療目的に好適な任意のクラスから選択され得る。したがって、治療剤は、治療目的に好適な任意のクラスから選択され得る。治療剤は、所望の治療目的および生物作用に従って選択され得る。例えば、一実施形態では、LNP内のceDNAが、がんを治療するために有用である場合、追加の化合物は、抗がん剤（例えば、化学療法剤、標的がん療法（小分子、抗体、または抗体-薬物コンジュゲートを含むが、これらに限定されない））であり得る。一実施形態では、ceDNAを含有するLNPが、感染症を治療するために有用である場合、追加の化合物は、抗微生物剤（例えば、抗生物質または抗ウイルス化合物）であり得る。一実施形態では、ceDNAを含有するLNPが、免疫疾患または障害を治療するために有用である場合、追加の化合物は、免疫応答を調節する化合物（例えば、免疫抑制剤、免疫刺激性化合物、または1つ以上の特定の免疫経路を調節する化合物）であり得る。一実施形態では、異なるタンパク質または異なる化合物（治療薬など）をコードするceDNAなどの、異なる化合物を含有する異なる脂質粒子の異なるカクテルを、本発明の組成物および方法で使用することができる。一実施形態では、追加の化合物は、免疫調節剤である。例えば、追加の化合物は、免疫抑制剤である。いくつかの実施形態では、追加の化合物は、免疫刺激性である。

30

40

【実施例】

【0317】

以下の実施例は、限定ではない例証によって提供される。本明細書に記載される野生型または修飾型ITRのうちのいずれかからceDNAベクターを構築できること、および以下の例示的な方法を使用して、そのようなceDNAベクターの活性を構築し、評価できることを当業者は理解するであろう。これらの方法は、ある特定のceDNAベクターを用いて例示されているが、それらは、説明に沿って任意のceDNAベクターに適用可能である。

【0318】

実施例1：昆虫細胞ベースの方法を使用してceDNAベクターを構築する

50

ポリヌクレオチド構築物テンプレートを使用したc e D N Aベクターの産生は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、P C T / U S 1 8 / 4 9 9 9 6の実施例1に記載される。例えば、本発明のc e D N Aベクターを生成するために使用されるポリヌクレオチド構築物テンプレートは、c e D N A－プラスミド、c e D N A－バクミド、および／またはc e D N A－バキュロウイルスであり得る。理論に限定されるものではないが、許容宿主細胞中、例えば、R e pの存在下、2つの対称I T R（I T Rのうちの少なくとも1つが、野生型I T R配列に対して修飾されている）および発現構築物を有するポリヌクレオチド構築物テンプレートは、c e D N Aベクターを産生するように複製する。c e D N Aベクター産生は、R e pタンパク質を介して、第1の、テンプレート骨格（例えば、c e D N A－プラスミド、c e D N A－バクミド、c e D N A－バキュロウイルスゲノムなど）からのテンプレートの切除（「レスキュー」）、および第2の、切除したc e D N AベクターのR e p媒介型複製の2つのステップを経る。

【0319】

c e D N Aベクターを産生するための例示的な方法は、本明細書に記載されるc e D N A－プラスミドに由来する。図1 Aおよび1 Bを参照すると、各c e D N A－プラスミドのポリヌクレオチド構築物テンプレートは、左修飾型I T Rおよび右修飾型I T Rの両方を含み、I T R配列の間には、（i）エンハンサー／プロモーター、（i i）導入遺伝子のクローニング部位、（i i i）転写後応答エレメント（例えば、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント（W P R E））、（i v）ポリアデニル化シグナル（例えば、ウシ成長ホルモン遺伝子（B G H p A）から）を有する。固有の制限エンドヌクレアーゼ認識部位（R 1～R 6）（図1 Aおよび図1 Bに示される）もまた、各構成成分の間に導入して、構築物中の特定部位への新たな遺伝子構成成分の導入を促進する。R 3（P m e I）5'－G T T T A A A C－3'およびR 4（P a c I）5'－T T A A T T A A－3'、酵素部位は、導入遺伝子のオープンリーディングフレームを導入するために、クローニング部位に設計される。これらの配列を、T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c から取得したp F a s t B a c H T Bプラスミドにクローニングした。

【0320】

c e D N A－バクミドの産生：

D H 1 0 B a c コンピテント細胞（M A X E F F I C I E N C Y（登録商標）D H 1 0 B a c（商標）コンピテント細胞、T h e r m o F i s h e r）を、製造元の指示によるプロトコルに従って、試験プラスミドまたは制御プラスミドのいずれかで形質転換する。D H 1 0 B a c細胞中のプラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組換えを誘導して、組換えc e D N A－バクミドを生成した。バクミドおよびトランスポサゼプラスミドの形質転換体および維持のために選択する抗生物質とともに、X－g a l およびI P T Gを含有する細菌寒天平板上のE．c o l i中の青白スクリーニングに基づいて（Φ80 d l a c Z Δ M 1 5 マーカーは、バクミドベクターからのβ－ガラクトシダーゼ遺伝子のα－相補性を提供する）正の選択をスクリーニングすることによって、組換えバクミドを選択する。β－ガラクトシダーゼ指標遺伝子を妨害する転位によって引き起こされた白色コロニーを、採取し、10 mLの培地中で培養する。

【0321】

組換えc e D N A－バクミドを、E．c o l iから単離し、F u g e n e H Dを使用し、S f 9またはS f 2 1昆虫細胞中にトランスフェクションして、感染性バキュロウイルスを産生する。付着したS f 9またはS f 2 1昆虫細胞を、25℃のT 2 5フラスコ中の50 mLの培地で培養した。4日後、培養培地（P 0ウイルスを含有する）を細胞から取り除き、0.45 μmフィルターで濾過し、感染性バキュロウイルス粒子を細胞または細胞残屑から分離する。

【0322】

任意選択的に、第1世代のバキュロウイルス（P 0）を、ナীব S f 9またはS f 2 1昆虫細胞を感染させることによって50～500 mLの培地中で増幅させた。オービタルシェーカー培養器内の懸濁液培養物中の細胞を、130 rpm、25℃で維持し、細胞

が（14～15 nmのナイプ直径から）18～19 nmの直径に到達するまで、細胞直径および生存率、ならびに約 4.0×10^6 細胞/mLの密度をモニタリングする。感染3日後～8日後に、培地中のP1バキュロウイルス粒子を、遠心分離後に収集し、細胞および残屑を除去した後、 $0.45 \mu\text{m}$ フィルターで濾過する。

【0323】

試験構築物を含有するceDNA-バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性または力価を決定した。具体的には、 2.5×10^6 細胞/mLの $4 \times 20 \text{ mL}$ Sf9細胞培養物を、次の希釈1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000のP1バキュロウイルスで処理し、25～27℃でインキュベーションした。感染性は、細胞直径増加の速度および細胞周期停止、ならびに細胞生存率の変化によって4～5日間にわたって毎日決定する。

【0324】

参照により全体が本明細書に組み込まれる、PCT/US18/49996の図8Aに開示される「Rep-プラスミド」を、Rep78およびRep52またはRep68およびRep40の両方を含むpFASTBAC（商標）二重発現ベクター（Thermo Fisher）において産生する。Rep-プラスミドを、製造元によって提供されるプロトコルに従って、DH10Bacコンピテント細胞（MAX EFFICIENCY（登録商標）DH10Bac（商標）コンピテント細胞（Thermo Fisher）中に形質転換する。DH10Bac細胞中のRep-プラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組換えを誘導して、組換えバクミド（「Rep-バクミド」）を産生する。X-galおよびIPTGを含有する細菌寒天平板上のE. coli中の青白スクリーニング（ $\phi 80 \text{ d lacZ} \Delta M15$ マーカーは、バクミドベクターからの β -ガラクトシダーゼ遺伝子の α -相補性を提供する）を含む正の選択によって、組換えバクミドを選択する。単離された白色コロニーを採取し、10 mLの選択培地（LBブロス中のカナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン）中に播種した。組換えバクミド（Rep-バクミド）をE. coliから単離し、Rep-バクミドをSf9またはSf21昆虫細胞中にトランスフェクションして、感染性バキュロウイルスを産生する。

【0325】

Sf9またはSf21昆虫細胞を、50 mLの培地中で4日間培養し、感染性組換えバキュロウイルス（「Rep-バキュロウイルス」）を、培養物から単離する。任意選択的に、第1世代のRep-バキュロウイルス（P0）を、ナイプSf9またはSf21昆虫細胞を感染させることによって増幅させ、50～500 mLの培地中で培養する。感染3日後～8日後に、培地中のP1バキュロウイルス粒子を、遠心分離によって細胞を分離するか、または濾過もしくは別の分画プロセスのいずれかによって収集する。Rep-バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性を決定する。具体的には、 2.5×10^6 細胞/mLの $4 \times 20 \text{ mL}$ Sf9細胞培養物を、次の希釈1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000のP1バキュロウイルスで処理し、インキュベーションする。感染性は、細胞直径増加の速度および細胞周期停止、ならびに細胞生存率の変化によって4～5日間にわたって毎日決定した。

【0326】

ceDNAベクター生成および特徴付け

図4Bを参照して、次に、（1）ceDNA-バクミドを含有する試料またはceDNA-バキュロウイルス、および（2）上記のRep-バキュロウイルスのいずれかを含有するSf9昆虫細胞培養培地を、Sf9細胞（ 2.5×10^6 細胞/mL、20 mL）の新鮮な培養物に、それぞれ1:1000および1:10,000の比で添加した。次いで、細胞を25℃、130 rpmで培養した。同時感染の4～5日後に、細胞の直径および生存率が検出される。生存率が約70～80%で細胞直径が18～20 nmに到達した場合、細胞培養物を遠心分離し、培地を取り除き、細胞ペレットを収集した。最初に、細胞ペレットを、適量の水性培地（水または緩衝液のいずれか）に再懸濁する。ceDNAベクターを、単離し、Qiagen MIDIPLUS（商標）精製プロトコル（Qiagen

10

20

30

40

50

n、カラム当たり0.2mgの処理された細胞ペレット質量)を使用して、細胞から精製した。

【0327】

Sf9昆虫細胞から産生および精製されるceDNAベクターの収率は、最初に、260nmでのUV吸光度に基づいて決定された。

【0328】

ceDNAベクターは、図4Dに例示されるような未変性条件または変性条件下で、アガロースゲル電気泳動によって同定することによって評価することができ、(a)制限エンドヌクレアーゼ切断およびゲル電気泳動分析後の、未変性ゲルに対して変性ゲル上で2倍のサイズで移行する特徴的なバンドの存在、ならびに(b)未切断材料の変性ゲル上の単量体および二量体(2x)バンドの存在は、ceDNAベクターの存在に特有である。

【0329】

単離されたceDNAベクターの構造を、共感染Sf9細胞から得られたDNA(本明細書に記載されるように)を、制限エンドヌクレアーゼで消化することによって、a)ceDNAベクター内の単一切断部位のみの存在、およびb)0.8%変性アガロースゲル(>800bp)上で分画したときに明らかに見えるほど十分に大きい、得られる断片についてさらに分析した。図4Dおよび4Eに示されるように、非連続的な構造を有する直鎖状DNAベクターおよび直鎖状で連続的な構造を有するceDNAベクターは、それらの反応産物のサイズによって区別することができ、例えば、非連続的な構造を有するDNAベクターは、1kbおよび2kb断片を産生することが期待されるが、連続的な構造を有する非カプシド化ベクターは、2kbおよび4kb断片を産生することが期待される。

【0330】

したがって、定義によって必要とされるように、単離されたceDNAベクターが共有結合性閉端であることを定性的に実証するために、試料を、特定のDNAベクター配列の文脈において、単一制限部位を有すると同定された制限エンドヌクレアーゼで消化させ、好ましくは、等しくないサイズ(例えば、1000bpおよび2000bp)の2つの切断産物をもたらす。変性ゲル(2つの相補的DNA鎖を分離する)上の消化および電気泳動に続いて、直鎖状の非共有結合的閉鎖状DNAは、2つのDNA鎖が連結され、展開されて2倍の長さである場合(但し、一本鎖である)、1000bpおよび2000bpのサイズで溶解するが、共有結合的閉鎖状DNA(すなわち、ceDNAベクター)は、2倍サイズ(2000bpおよび4000bp)で溶解するであろう。さらに、DNAベクターの単量体、二量体、およびn量体形態の消化は、多量体DNAベクターの末端間連結に起因して、同じサイズの断片としてすべて溶解する(図4Dを参照されたい)。

【0331】

本明細書で使用される場合、「未変性ゲルおよび変性条件下でのアガロースゲル電気泳動によるDNAベクターの特定のためのアッセイ」という句は、制限エンドヌクレアーゼ消化に続いて、消化産物の電気泳動的評価を実施することによって、ceDNAの閉端性を評価するためのアッセイを指す。1つのそのような例示的アッセイを以下に示すが、当業者であれば、この実施例に関する当該技術分野において既知の多くの変形が可能であることを理解するであろう。およそ1/3倍および2/3倍のDNAベクター長の産物を生成するであろう目的のceDNAベクターに対する単一切断酵素であるように、制限エンドヌクレアーゼが選択される。これは、未変性ゲルおよび変性ゲルの両方でバンドを溶解する。変性前に、試料から緩衝液を取り除くことが重要である。Qiagen PCRクリーンアップキットまたは脱塩「スピンカラム」、例えば、GE HEALTHCARE ILLUSTRATE(商標)MICROSPIN(商標)G-25カラムは、エンドヌクレアーゼ消化のためのいくつかの当該技術分野において既知のオプションである。アッセイは、例えば、i)DNAを適切な制限エンドヌクレアーゼで消化すること、ii)例えば、Qiagen PCRクリーンアップキットに適用し、蒸留水で溶出すること、iii)10倍変性溶液(10倍=0.5M NaOH、10mM EDTA)を添加し、10倍色素を添加し、緩衝せず、10倍変性溶液を、1mM EDTAおよび200mM NaOH

で以前にインキュベーションされた0.8~1.0%ゲル上で4倍に添加することによって調製されたDNAラダーと一緒に分析して、NaOH濃度が、ゲルおよびゲルボックス中で均一であり、1倍変性溶液(50mM NaOH、1mM EDTA)の存在下でゲルを流動させることを保証することを含む。当業者であれば、サイズおよび所望のタイミングの結果に基づいて、電気泳動を実行するために使用する電圧を理解するであろう。電気泳動後に、ゲルを排出し、1倍TBEまたはTAE中で中和し、蒸留水または1倍SYBR Goldを含む1倍TBE/TAEに移す。次いで、例えば、Thermo FisherのSYBR(登録商標)Gold核酸ゲル染料(DMSO中10,000倍濃縮物)および落射蛍光灯(青色)またはUV(312nm)を用いてバンドを可視化することができる。

10

【0332】

生成されたceDNAベクターの純度は、任意の当該技術分野において既知の方法を使用して評価され得る。1つの例示的な非限定的方法として、試料の全体UV吸光度に対するceDNA-プラスミドの寄与は、ceDNAベクターの蛍光強度を標準と比較することによって推定され得る。例えば、UV吸光度に基づいて、4μgのceDNAベクターをゲル上にロードし、ceDNAベクター蛍光強度が、1μgであることが知られている2kbバンドに相当する場合、1μgのceDNAベクターが存在し、ceDNAベクターは、全UV吸光材料の25%である。次いで、ゲル上のバンド強度を、バンドが表す計算されたインプットに対してプロットする。例えば、全ceDNAベクターが8kbであり、切除された比較バンドが2kbである場合、バンド強度は、全インプットの25%としてプロットされ、この場合、1.0μgのインプットに対して0.25μgとなる。ceDNAベクタープラスミドタイトレーションを使用して、標準曲線をプロットする場合、回帰直線等式を使用して、ceDNAベクターバンドの量を計算し、次いで、これを使用して、ceDNAベクターにより表される全インプットのパーセント、または純度パーセントを決定することができる。

20

【0333】

比較目的のため、実施例1は、昆虫細胞ベースの方法およびポリヌクレオチド構築物テンプレートを使用するceDNAベクターの産生を記載し、また参照により全体が本明細書に組み込まれるPCT/US18/49996の実施例1にも記載される。例えば、実施例1に従って本発明のceDNAベクターを生成するために使用されるポリヌクレオチド構築物テンプレートは、ceDNA-プラスミド、ceDNA-バクミド、および/またはceDNA-バキュロウイルスであり得る。理論に限定されるものではないが、許容宿主細胞中、例えば、Repの存在下、2つの対称ITR(ITRのうちの少なくとも1つが、野生型ITR配列に対して修飾されている)および発現構築物を有するポリヌクレオチド構築物テンプレートは、ceDNAベクターを産生するように複製する。ceDNAベクター産生は、Repタンパク質を介して、第1の、テンプレート骨格(例えば、ceDNA-プラスミド、ceDNA-バクミド、ceDNA-バキュロウイルスゲノムなど)からのテンプレートの切除(「レスキュー」)、および第2の、切除したceDNAベクターのRep媒介型複製の2つのステップを経る。

30

【0334】

ceDNA-バクミドの産生:

DH10Bacコンピテント細胞(MAX EFFICIENCY(登録商標)DH10Bac(商標)コンピテント細胞、Thermo Fisher)を、製造元の指示によるプロトコルに従って、試験プラスミドまたは制御プラスミドのいずれかで形質転換した。DH10Bac細胞中のプラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組換えを誘導して、組換えceDNA-バクミドを生成した。バクミドおよびトランスポサゼプラスミドの形質転換体および維持のために選択する抗生物質とともに、X-galおよびIPTGを含有する細菌寒天平板上のE.coli中の青白スクリーニングに基づいて(Φ80dlacZΔM15マーカーは、バクミドベクターからのβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のα-相補性を提供する)正の選択をスクリーニングすることによって、組換

40

50

えバクミドを選択した。β-ガラクトシダーゼ指標遺伝子を妨害する転位によって引き起こされた白色コロニーを、採取し、10 mLの培地中で培養した。

【0335】

組換えceDNA-バクミドを、E. coliから単離し、FugeneHDを使用してSf9またはSf21昆虫細胞中にトランスフェクションして、感染性バキュロウイルスを産生した。付着したSf9またはSf21昆虫細胞を、25℃のT25フラスコ中の50 mLの培地で培養した。4日後、培養培地（P0ウイルスを含有する）を細胞から取り除き、0.45 μmフィルターで濾過し、感染性バキュロウイルス粒子を細胞または細胞残屑から分離した。

【0336】

任意選択的に、第1世代のバキュロウイルス（P0）を、ナイーブSf9またはSf21昆虫細胞を感染させることによって50～500 mLの培地中で増幅させた。オービタルシェーカー培養器内の懸濁液培養物中の細胞を、130 rpm、25℃で維持し、細胞が（14～15 nmのナイーブ直径から）18～19 nmの直径に到達するまで、細胞直径および生存率、ならびに約4.0E+6細胞/mLの密度をモニタリングした。感染3日後～8日後に、培地中のP1バキュロウイルス粒子を、遠心分離後に収集し、細胞および残屑を除去した後、0.45 μmフィルターで濾過した。

【0337】

試験構築物を含むceDNA-バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性または力価を決定した。具体的には、2.5E+6細胞/mLの4×20 mL Sf9細胞培養物を、次の希釈1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000のP1バキュロウイルスで処理し、25～27℃でインキュベーションした。感染性は、細胞直径増加の速度および細胞周期停止、ならびに細胞生存率の変化によって4～5日間にわたって毎日決定した。

【0338】

「Rep-プラスミド」は、Rep78またはRep68およびRep52またはRep40の両方を含むpFASTBAC（商標）二重発現ベクター（ThermoFisher）において産生された。Rep-プラスミドを、製造元によって提供されるプロトコルに従って、DH10Bacコンピテント細胞（MAX EFFICIENCY（登録商標）DH10Bac（商標）コンピテント細胞（ThermoFisher））中に形質転換した。DH10Bac細胞中のRep-プラスミドとバキュロウイルスシャトルベクターとの間の組換えを誘導して、組換えバクミド（「Rep-バクミド」）を生成した。X-galおよびIPTGを含有する細菌寒天平板上のE. coli中の青白スクリーニング（Φ80dlacZΔM15マーカは、バクミドベクターからのβ-ガラクトシダーゼ遺伝子のα-相補性を提供する）を含む正の選択によって、組換えバクミドを選択した。単離された白色コロニーを採取し、10 mLの選択培地（LBブロス中のカナマイシン、ゲンタマイシン、テトラサイクリン）中に播種した。組換えバクミド（Rep-バクミド）をE. coliから単離し、Rep-バクミドをSf9またはSf21昆虫細胞中にトランスフェクションして、感染性バキュロウイルスを産生した。

【0339】

Sf9またはSf21昆虫細胞を、50 mLの培地中で4日間培養し、感染性組換えバキュロウイルス（「Rep-バキュロウイルス」）を、培養物から単離した。任意選択的に、第1世代のRep-バキュロウイルス（P0）を、ナイーブSf9またはSf21昆虫細胞を感染させることによって増幅させ、50～500 mLの培地中で培養した。感染3日後～8日後に、培地中のP1バキュロウイルス粒子を、遠心分離によって細胞を分離するか、または濾過もしくは別の分画プロセスのいずれかによって収集した。Rep-バキュロウイルスを収集し、バキュロウイルスの感染活性を決定した。具体的には、2.5×10⁶細胞/mLの4×20 mL Sf9細胞培養物を、次の希釈1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000のP1バキュロウイルスで処理し、インキュベーションした。感染性は、細胞直径増加の速度および細胞周期停止、ならびに

10

20

30

40

50

細胞生存率の変化によって4～5日間にわたって毎日決定した。

【0340】

実施例2：二本鎖DNA分子からの切除による合成ceDNA産生

ceDNAベクターの合成産生は、参照により全体が本明細書に組み込まれる、2019年1月18日に出願された国際出願第19/14122号の実施例2～6に記載される。二本鎖DNA分子の切除を伴う合成方法を使用してceDNAベクターを産生する1つの例示的な方法。簡潔には、ceDNAベクターは、二本鎖DNA構築物を使用して生成され得る。例えば、PCT/US19/14122の図7A～8Eを参照されたい。いくつかの実施形態では、二本鎖DNA構築物はceDNAプラスミドであり、例えば、2018年12月6日に出願された国際特許出願第2018/064242号の図6を参照されたい。

10

【0341】

いくつかの実施形態では、ceDNAベクターを作製するための構築物は、本明細書に記載される調節スイッチを含む。

【0342】

例示の目的で、実施例1は、この方法を使用して生成された例示的な閉端DNAベクターとして、ceDNAベクターを産生することを説明する。しかしながら、この実施例では、ITRおよび発現カセット（例えば、異種核酸配列）を含む二本鎖ポリヌクレオチドの切除に続いて、本明細書に記載される遊離3'および5'末端のライゲーションによって閉端DNAベクターを生成するインビトロ合成産生方法を例証するためにceDNAベクターが例示されているが、当業者は、上で例証されるように、ミニストリングDNA、doggy bone（商標）DNA、ダンベルDNAなどを含むが、これらに限定されない任意の所望の閉端DNAベクターが生成されるように、二本鎖DNAポリヌクレオチド分子を修飾することができることを認識する。導入遺伝子および治療用タンパク質を産生するための例示的なceDNAベクターは、実施例2に記載の合成産生方法によって産生することができる。

20

【0343】

この方法は、(i)二本鎖DNA構築物から発現カセットをコードする配列を切除することと、(ii)ITRのうちの1つ以上でヘアピン構造を形成することと、(iii)ライゲーションによって、例えば、T4 DNAリガーゼによって遊離5'および3'末端を結合することとを伴う。

30

【0344】

二本鎖DNA構築物は、5'から3'に順番に、第1の制限エンドヌクレアーゼ部位、上流ITR、発現カセット、下流ITR、および第2の制限エンドヌクレアーゼ部位を含む。次いで、二本鎖DNA構築物を1つ以上の制限エンドヌクレアーゼと接触させて、制限エンドヌクレアーゼ部位の両方で二本鎖切断を生成する。1つのエンドヌクレアーゼが両方の部位を標的とすることも、制限部位がceDNAベクターテンプレート内に存在しない限り、各部位を異なるエンドヌクレアーゼによって標的とすることもできる。これにより、制限エンドヌクレアーゼ部位の間の配列が、残りの二本鎖DNA構築物から切除される（PCT/US19/14122の図9を参照されたい）。ライゲーションすると、閉端DNAベクターが形成される。

40

【0345】

この方法で使用されるITRの一方または両方は、野生型ITRであり得る。修飾型ITRが使用されてもよく、ここで修飾は、BおよびB'アームならびに／またはCおよびC'アームを形成する配列における野生型ITRからの1つ以上のヌクレオチドの欠失、挿入、または置換を含み得（例えば、PCT/US19/14122の図6～8および10、図11Bを参照）、2つ以上のヘアピンループ（例えば、PCT/US19/14122の図6～8、図11Bを参照）または単一のヘアピンループ（例えば、PCT/US19/14122の図10A～10B、図11Bを参照）を有し得る。ヘアピンループ修飾型ITRは、既存のオリゴの遺伝子修飾によって、または新規の生物学的合成および／もし

50

くは化学的合成によって生成され得る。

【0346】

実施例3：オリゴヌクレオチドの構築によるc e DNAの産生

様々なオリゴヌクレオチドの集成を伴う合成方法を使用してc e DNAベクターを産生する別の例示的な方法は、P C T / U S 1 9 / 1 4 1 2 2の実施例3に提供されており、c e DNAベクターは、5'オリゴヌクレオチドおよび3' I T Rオリゴヌクレオチドを合成し、I T Rオリゴヌクレオチドを、発現カセットを含む二本鎖ポリヌクレオチドにライゲーションすることによって産生される。P C T / U S 1 9 / 1 4 1 2 2の図11Bは、5' I T Rオリゴヌクレオチドおよび3' I T Rオリゴヌクレオチドを、発現カセットを含む二本鎖ポリヌクレオチドにライゲーションする例示的な方法を示す。

10

【0347】

I T RオリゴヌクレオチドはW T - I T Rを含むことができる（例えば、全体が本明細書に組み込まれるP C T / U S 1 9 / 1 4 1 2 2の図6A、6B、7A、および7Bも参照されたい）。例示的なI T Rオリゴヌクレオチドとしては、P C T / U S 1 9 / 1 4 1 2 2の表7に記載されるものが挙げられるが、これらに限定されない。修飾型I T Rは、BおよびB'アームならびに／またはCおよびC'アームを形成する配列における野生型I T Rからの1つ以上のヌクレオチドの欠失、挿入、または置換を含み得る。無細胞合成で使用される、本明細書に記載されるW T - I T Rまたはm o d - I T Rを含むI T Rオリゴヌクレオチドは、遺伝子修飾または生物学のおよび／もしくは化学的合成によって生成することができる。本明細書で考察されるように、実施例2および3のI T Rオリゴヌクレオチドは、本明細書で考察されるように、対称または非対称構成のW T - I T Rまたは修飾型I T R（m o d - I T R）を含み得る。

20

【0348】

実施例4：一本鎖DNA分子によるc e DNA産生

合成方法を使用してc e DNAベクターを産生する別の例示的な方法は、P C T / U S 1 9 / 1 4 1 2 2の実施例4において提供され、センス発現カセット配列に隣接しアンチセンス発現カセットに隣接する2つのアンチセンスI T Rに共有結合的に結合される2つのセンスI T Rを含む一本鎖の直鎖状DNAを使用し、次いで、この一本鎖の直鎖状DNAの末端をライゲーションして、閉端一本鎖分子を形成する。非限定的な一例は、一本鎖DNA分子を合成および／または産生し、分子の一部をアニーリングして、二次構造の1つ以上の塩基対合領域を有する単一の直鎖状DNA分子を形成し、次いで遊離5'および3'末端を互いにライゲーションして、閉鎖状一本鎖分子を形成する。

30

【0349】

c e DNAベクターの産生のための例示的な一本鎖DNA分子は、5'から3'へ、第1のセンスI T R、センス発現カセット配列、第2のセンスI T R、第2のアンチセンスI T R、アンチセンス発現カセット配列、および第1のアンチセンスI T Rを含む。

【0350】

実施例4の例示的な方法で使用するための一本鎖DNA分子は、本明細書に記載される任意のDNA合成方法論、例えば、インビトロDNA合成によって形成され得るか、またはヌクレアーゼでDNA構築物（例えば、プラスミド）を切断し、得られたd s DNA断片を融解して、s s DNA断片を提供することによって提供され得る。

40

【0351】

アニーリングは、センス配列およびアンチセンス配列の対の計算された融解温度を下回って温度を下げることによって達成され得る。融解温度は、特定のヌクレオチド塩基含有量、および使用している溶液の特性、例えば、塩濃度に依存する。任意の所与の配列および溶液の組み合わせの融解温度は、当業者によって容易に計算される。

【0352】

アニーリングされた分子の遊離5'および3'末端は、互いにライゲーションされるか、またはヘアピン分子にライゲーションされてc e DNAベクターを形成することができる。好適な例示的ライゲーション方法論およびヘアピン分子は、実施例2および3に記載

50

される。

【0353】

実施例5：c e DNAの精製および／または産生の確認

例えば、実施例1に記載される昆虫細胞ベースの産生方法、または実施例2～4に記載される合成産生方法を含む、本明細書に記載される方法によって産生されたDNAベクター産物のいずれも、例えば、熟練者に一般に知られている方法を使用して、不純物、未使用の構成要素、または副産物を除去するために精製することができ、かつ／または分析して、産生されたDNAベクター（この例では、c e DNAベクター）が所望の分子であることを確認することができる。DNAベクター、例えばc e DNAの精製のための例示的な方法は、Qiagen Midi Plus精製プロトコル（Qiagen）を使用することおよび／またはゲル精製によるものである。

10

【0354】

以下は、c e DNAベクターの同一性を確認するための例示的な方法である。

【0355】

c e DNAベクターは、図4Dに例示されるような未変性条件または変性条件下で、アガロースゲル電気泳動によって同定することによって評価することができ、（a）制限エンドヌクレアーゼ切断およびゲル電気泳動分析後の、未変性ゲルに対して変性ゲル上で2倍のサイズで移行する特徴的なバンドの存在、ならびに（b）未切断材料の変性ゲル上の単量体および二量体（2x）バンドの存在は、c e DNAベクターの存在に特有である。

【0356】

単離されたc e DNAベクターの構造を、精製されたDNAを、選択された制限エンドヌクレアーゼで消化することによって、a）c e DNAベクター内の単一切断部位のみの存在、およびb）0.8%変性アガロースゲル（>800bp）上で分画した場合に明らかに見えるほど十分に大きな、得られる断片についてさらに分析する。図4Eに示されるように、非連続的な構造を有する直鎖状DNAベクターおよび直鎖状で連続的な構造を有するc e DNAベクターは、それらの反応産物のサイズによって区別することができ、例えば、非連続的な構造を有するDNAベクターは、1kbおよび2kb断片を産生することが予想されるが、連続的な構造を有するc e DNAベクターは、2kbおよび4kb断片を産生することが予想される。

20

【0357】

したがって、定義によって必要とされるように、単離されたc e DNAベクターが共有結合性閉端であることを定性的に実証するために、試料を、特定のDNAベクター配列の文脈において、単一制限部位を有すると同定された制限エンドヌクレアーゼで消化させ、好ましくは、等しくないサイズ（例えば、1000bpおよび2000bp）の2つの切断産物をもたらす。変性ゲル（2つの相補的DNA鎖を分離する）上の消化および電気泳動に続いて、直鎖状の非共有結合的閉鎖状DNAは、2つのDNA鎖が連結され、展開されて2倍の長さである場合（但し、一本鎖である）、1000bpおよび2000bpのサイズで溶解するが、共有結合的閉鎖状DNA（すなわち、c e DNAベクター）は、2倍サイズ（2000bpおよび4000bp）で溶解するであろう。さらに、DNAベクターの単量体、二量体、およびn量体形態の消化は、多量体DNAベクターの末端間連結に起因して、同じサイズの断片としてすべて溶解する（図4Eを参照されたい）。

30

【0358】

生成されたc e DNAベクターの純度は、任意の当該技術分野において既知の方法を使用して評価され得る。1つの例示的な非限定的方法として、試料の全体UV吸光度に対するc e DNA-プラスミドの寄与は、c e DNAベクターの蛍光強度を標準と比較することによって推定され得る。

40

【0359】

実施例6：脂質ナノ粒子製剤の調製

ss-OPを含むc e DNA脂質ナノ粒子（LNP）製剤は以下のように調製した。簡単に説明すると、2つの相の急速混合を実行して中間体LNPを形成し、c e DNA溶液

50

および脂質溶液をNano Assembler上で3:1の流速比で総流速12 mL/分で混合した。中間体LNPを1~3 volのDPBSで希釈してエタノール濃度を下げ、中間体LNPを安定させた。次いでエタノールを除去し、透析チューブまたはフロートライザー（小規模の場合）のいずれかで、4℃で一晩透析することにより外部緩衝液をDPBSに置き換えた。次に、濃縮ステップを実施した。中間体LNPを、Amicon Ultra-15 (10 KD MWCO) チューブを使用して、2000×g、4℃で20分間、3回濃縮した。LNPを0.2 μmポア滅菌フィルターで濾過した。LNPの粒子サイズは、Malvern Zetasizer Nano ZS (Malvern, UK) を使用した準弾性光散乱によって決定でき、ceDNA封入は、Quant-iT PicoGreen dsDNAアッセイキット (Thermo Fisher Scientific) によって測定できる。

10

【0360】

脂質ナノ粒子 (LNP) を、約10:1~60:1の全脂質対ceDNAの重量比で調製した。好ましくは、LNPを、15:1~40:1の全脂質対ceDNA重量比で調製した。簡単に言えば、凝縮剤（例えば、ss-OPまたはss-Pazなどのカチオン性脂質）、非カチオン性脂質（例えば、DSPC、DOPE、またはDOPC）、膜の完全性を提供する成分（ステロールなど、例えば、コレステロール）およびコンジュゲートされた脂質分子（例えば、PEG-脂質、例えば、1-（モノメトキシポリエチレングリコール）-2, 3-ジミリストイルグリセロール、平均PEG分子量2000（「PEG 2000-DMG」））は、所定のモル比（例えば、各成分について約51:7:40:2 ±1）でアルコール（例えば、エタノール）に可溶化された。特定の実施例では、LNPは非カチオン性脂質（DSPC、DOPE、DOPCなど）を使用せずに調製され、3つの異なる脂質成分を含むため、例えば「ss-Paz3」または「ss-OP3」と称される（表1、LNP番号3および5を参照）。LNP番号6~19はss-OP4の変種であり、LNP番号6を図7~18で「ss-OP4」と指定された動物実験で使用した。

20

【0361】

ceDNAを緩衝液（1×Dulbeccoのリン酸緩衝食塩水、DPBS）で所望の濃度に希釈した。例えば、ceDNAを、酢酸ナトリウム、酢酸ナトリウムおよび塩化マグネシウム、クエン酸、リンゴ酸、またはリンゴ酸および塩化ナトリウムを含む緩衝液中の0.1 mg/mL~0.25 mg/mLの濃度に希釈した。一例では、ceDNAを10~50 mMクエン酸緩衝液（pH 4.0）で0.2 mg/mLに希釈した。アルコール性脂質溶液を、例えば、シリンジポンプまたは衝突ジェットミキサーを使用して、約1:5~1:3 (vol/vol) の比率で、総流速が10 mL/分を超えるようにceDNA水溶液と混合した。いくつかの例では、アルコール性脂質溶液を、12 mL/分の流速で約1:3 (vol/vol) の比率で水性ceDNAと混合した。アルコールを除去し、透析により緩衝液をPBSに置き換えた。あるいは、遠心チューブを使用して緩衝液をDPBSに置き換えた。アルコール除去および同時緩衝液交換は、例えば、透析またはタンジェンシャル・フロー・フィルトレーションによって達成された。得られた脂質ナノ粒子を0.2 μmポア滅菌フィルターで濾過した。

30

【0362】

ある研究では、ss-OP（式I）、DOPC、コレステロールおよびDMG-PEG 2000（51:7:40:2のモル比、各成分に対して±1）、またはMC3、DSPC、コレステロールおよびDMG-PEG 2000（50:10:38.5:1.5のモル比）を含む脂質溶液を使用して、例示的なceDNAを含む脂質ナノ粒子を調製した。緩衝液中のceDNAの水溶液を調製した。Nano Assemblerを使用して、脂質溶液およびceDNA溶液を、3:2 (vol/vol) の脂質対ceDNA比率で、総流速12 mL/分で混合した。表1は、この研究で調製された例示的なLNPを示す。

40

【表 1 - 1】

表 1：例示的な LNP

LNP 番号	脂質ミックス*	脂質モル比	脂質フィード [mg/mL]	ceDNA
1	ss-EC:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	68.0:29.1:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
2	ss-EC:DOPC:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	51.0:7.3:38.8:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
3	ss-Paz:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	68.0:29.1:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
4	ss-Paz:DOPC:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	51.0:7.3:38.8:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
5	ss-OP:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	68.0:29.1:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
6	ss-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	51.0:7.3:38.8:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
7	ss-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	50:10:38.5:1.5	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
8	ss-OP:DOPE:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	50:10:38.5:1.5	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
9	ss-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	51.7:7.4:39.4:1.5	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
10	ss-OP:DSPC:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	51.0:7.3:38.8:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
11	ss-OP:DSPC:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	51.7:7.4:39.4:1.5	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
12	ss-OP:DOPE:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	51.0:7.3:38.8:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
13	ss-OP:DOPE:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	51.7:7.4:39.4:1.5	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
14	ss-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	47.5:10.0:40.7:1.8	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
15	ss-OP:DSPC:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	47.5:10.0:40.7:1.8	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
16	ss-OP:DOPE:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	47.5:10.0:40.7:1.8	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ

【表 1 - 2】

17	ss-OP:DOPE:Chol:C ₁₈ -PEG ₂₀₀₀	51.7:7.4:39.4:1.5	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
18	ss-OP:DOPE:Chol:C ₁₈ -PEG ₂₀₀₀	51.0:7.3:38.8:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
19	ss-OP:DOPE:Chol:C ₁₈ -PEG ₂₀₀₀	50.0:7.1:38.1:4.8	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
20	ss-OP:MC3:DOPE:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	25.5:25.5:7.3:38.8:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
21	ss-OP:MC3:DOPE:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	34.0:17.0:7.3:38.8:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
22	ss-OP:MC3:DOPE:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	40.8:10.2:7.3:38.8:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
23	ss-OP:MC3:DOPE:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	45.9:5.1:7.3:38.8:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ
24	ss-OP:MC3:DOPE:Chol:DMG-PEG ₂₀₀₀	48.4:2.5:7.3:38.8:2.9	2.6	ceDNA-ルシフェラーゼ

*DOPC=ジオレオイルホスファチジルコリン、DOPE=ジオレオイルホスファチジルエタノールアミン、DSPC=ジステアロイルホスファチジルコリン、MC3=ヘプタトリアコンタ-6,9,28,31-テトラエン-19-イル-4-(ジメチルアミノ)ブタノエート、Chol=コレステロール、PEG=1-(モノメトキシエチレングリコール)-2,3-ジミリスチルグリセロール (DMG-PEG₂₀₀₀)、ss-OP=COATSOME (登録商標) ss-OP および ss-EC=COATSOME (登録商標) ss-33/4PE-15。

【0363】

脂質粒子製剤の分析

脂質ナノ粒子のサイズおよびゼータ電位、ならびに脂質ナノ粒子へのceDNAの封入を決定した。粒子サイズは動的光散乱によって決定され、ゼータ電位は電気泳動光散乱 (Zetasizer Nano ZS, Malvern Instruments) によって測定された。結果を図15～17に示す。

【0364】

脂質粒子へのceDNAの封入を、Oligreen (登録商標) (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA) またはPicoGreen (登録商標) (Thermo Scientific) キットによって決定した。Oligreen (登録商標) またはPicoGreen (登録商標) は、溶液中のオリゴヌクレオチドおよび一本鎖DNAまたはRNAを定量化するための超高感度蛍光核酸染色剤であ

る。簡単に言えば、封入は、膜不透過性蛍光色素排除アッセイを実施することによって決定された。染料を脂質粒子製剤に添加した。蛍光強度を測定し、少量の非イオン性界面活性剤を添加したときに観察された蛍光と比較した。脂質二層の界面活性剤媒介性崩壊は、封入された c e D N A を放出し、それが膜不透過性色素と相互作用することを可能にする。c e D N A の封入は、 $E = (I_0 - I) / I_0$ として計算し、 I_0 は、界面活性剤を添加した場合の蛍光強度を示し、 I は、界面活性剤を添加しない場合の蛍光強度を示す。

【0365】

次に、LNPからの c e D N A の放出を決定した。アニオン性リポソームを模倣するエンドソームは D O P S : D O P C : D O P E (モル比 1 : 1 : 2) をクロロホルム中で混合し、続いて真空中で溶媒を蒸発させることによって調製した。乾燥した脂質フィルムを短時間の超音波処理で D P B S に再懸濁し、続いて 0.45 μm シリンジファイラーで濾過してアニオン性リポソームを形成した。

【0366】

血清を LNP 溶液に 1 : 1 (v o l / v o l) で添加し、37℃で20分間インキュベートした。次いで、混合物を、pH 7.4 または 6.0 のいずれかで、37℃でさらに15分間、D P B S 中の所望のアニオン性／カチオン性脂質モル比でアニオン性リポソームとともにインキュベートした。pH 7.4 または pH 6.0 での不含 c e D N A は、封入されていない c e D N A の含有量を決定することによって、P i c o G r e e n (T h e r m o S c i e n t i f i c) を LNP スラリー (C f r e e) に添加したときの蛍光を測定し、この値を 1% T r i t o n (登録商標) X-100 (C t o t a l) による L N P の溶解のときに得られた総 c e D N A 含有量と比較することによって計算され、 $f r e e \% = C f r e e / C t o t a l \times 100$ である。アニオン性リポソームとのインキュベーション後に放出された c e D N A % は、以下の式に基づいて計算された。

放出された c e D N A % = アニオン性リポソームと混合された不含 c e D N A % - D P B S と混合された不含 c e D N A %

【0367】

製剤化されたカチオン性脂質の p K a は、核酸の送達のための L N P の有効性と関連し得る (J a y a r a m a n e t a l, A n g e w a n d t e C h e m i e, I n t e r n a t i o n a l E d i t i o n (2012), 51 (34), 8529-8533、S e m p l e e t a l, N a t u r e B i o t e c h n o l o g y 28, 172-176 (2010) を参照。それらの両方は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれた)。p K a の好ましい範囲は、約 5 ~ 約 7 である。各カチオン性脂質の p K a を、2- (p-トルイジノ)-6-ナフタレンスルホン酸 (T N S) の蛍光に基づくアッセイを使用して、脂質ナノ粒子中で決定した。0.4 mM 全脂質の濃度での D P B S 中のカチオン性脂質 / D O P C / コレステロール / P E G - 脂質 (50 / 10 / 38.5 / 1.5 mol %) からなる脂質ナノ粒子は、本明細書および他に記載されるインラインプロセスを使用して調製され得る。T N S は、蒸留水中の 100 μM ストック溶液として調製され得る。小胞は、10 mM の H E P E S、10 mM の M E S、10 mM の酢酸アンモニウム、130 mM の N a C l を含有する 2 mL の緩衝溶液中の 24 μM 脂質に希釈され得、p H は、2.5 ~ 11 の範囲である。T N S 溶液のアリコートを追加して、1 μM の最終濃度にすることができ、続いて渦流混合発光強度を、321 nm の励起波長および 445 nm の発振波長を使用し、S L M A m i n c o S e r i e s 2 発光分光光度計において室温で測定した。S 字状最良適合分析は、蛍光データに適用することができ、p K a は、半最適蛍光強度を生じる p H として測定された。

【0368】

脂質ナノ粒子の A p o E への結合を以下のように決定した。L N P (c e D N A の 10 μg / mL) を、D P B S 中の等量の組換え A p o E 3 (500 μg / mL) とともに 37℃で20分間インキュベートした。インキュベーション後、LNP 試料を、D P B S を使用して 10 倍に希釈し、以下の条件に従って A K T A p u r e 150 (G E H e a l t h c a r e) でのヘパリンセファロースクロマトグラフィーによって分析した。

【表 A】

HiTrap クロマトグラフィー条件

カラム	HiTrap ヘパリンセファロース HP 1 mL
平衡化緩衝液	DPBS
洗浄緩衝液	DPBS
溶出緩衝液	10 mM のリン酸ナトリウム緩衝液の 1 M の NaCl、pH 7.0
流速	1 mL/分
注入量	500 µL
検出	260 nm

10

	CV	A (%)	B (%)
平衡化	1	100	0
カラム洗浄	4	100	0
溶出 (直鎖状)	10	0	100
平衡化	3	100	0

【0369】

20

インビトロ発現

脂質ナノ粒子に封入された c e DNA の発現を以下のようにアッセイした。HEK 293 細胞を、10 % のウシ胎児血清および 1 % のペニシリン-ストレプトマイシンで補充した DMEM + GlutaMAX (商標) 培地 (Thermo Scientific) 中の 5 % の CO₂ で 37 °C で維持した。トランスフェクションの前日に、30,000 細胞 / ウェルの密度で細胞を 96 ウェルプレートに播種した。Lipofectamine (商標) 3000 (Thermo Scientific) トランスフェクション試薬を使用して、100 ng / ウェルの対照 c e DNA - luc を製造元のプロトコルに従ってトランスフェクトした。対照 c e DNA を Opti-MEM (商標) (Thermo Scientific) で希釈し、P3000 (商標) 試薬を添加した。続いて、Lipofectamine (商標) 3000 を Opti-MEM (商標) の 3 % の最終濃度に希釈した。希釈した Lipofectamine (商標) 3000 を 1 : 1 の比率で希釈した c e DNA に添加し、室温で 15 分間インキュベートした。次いで、所望の量の c e DNA - 脂質複合体または LNP を、細胞を含有する各ウェルに直接添加した。細胞を 37 °C で 5 % CO₂ とともに 72 時間インキュベートした。

30

【0370】

実施例 7 : CD-1 マウスにおける c e DNA の LNP 製剤の評価

以下の研究を、マウスの SS 切断可能脂質を含有する LNP を評価するために実行した。本明細書に記載されるように、SS シリーズ脂質は、細胞内環境に応答できる二重感知モチーフを含有し、三級アミンは、膜不安定化のための酸性区画 (エンドソーム / リソソーム)、および還元環境 (細胞質) で切断できるジスルフィド結合に応答する。例示的な脂質ナノ粒子製剤を、実施例 6 に従って調製し、インビボで試験した。

40

【0371】

簡単に説明すると、c e DNA - luc は、上記のように SS 切断可能脂質および MC 3 を含有する LNP に製剤化され、雄の CD-1 マウスに 0.5 mg / kg 静脈内で投与された。1 つの LNP には、パルミチン酸デキサメタゾンが含まれ、ss-Paz 3 (ss-PalmE-Paz 4-C2、SS-33 / 1PZ-21 としても知られる) LNP に c e DNA - luc と共製剤化された。上記のように、番号 3 および 4 は、ss-OP 3 および ss-OP 4、または ss-Paz 3 および ss-Paz 4 では、LNP 製剤の全脂質成分を表す。例えば、ss-OP 3 LNP には、ss-OP、コレステロール、お

50

よび PEG-DMG の 3 つの異なる脂質成分が含有される。同様に、ss-OP4 LNP は、ss-OP、DOPC、コレステロール、および PEG-DMG の 4 つの異なる脂質成分を有する。パルミチン酸デキサメタゾン (DexPalm) は、白血球および組織マクロファージを阻害し、炎症反応を低減する抗炎症剤である。エンドポイントには、体重、サイトカイン、肝臓／脾臓の生体内分布 (qPCR)、およびルシフェラーゼ活性 (IVIS) が含まれた。研究デザインを以下の表 2 に概説する。

【表 2】

表 2.

群番号	群当たりの動物	試験材料	用量レベル (mg/kg)	用量体積 (mL/kg)	治療レジメン、ROA	終末時点
1	6	MC3:ポリ C	0.5	5	静脈内で一旦オン 0 日目 ^a	0 日目 群当たり N=2 最大 28 日目 群当たり N=4
2	6	MC3:ceDNA-luc	0.5			
3	6	ss-Paz3:ポリ C	0.5			
4	6	ss-Paz3:ceDNA-luc	0.5			
5	6	ss-Paz3:ceDNA-luc+DexPalm	0.5			
6	6	ss-Paz4:ポリ C	0.5			
7	6	ss-Paz4:ceDNA-luc	0.5			
8	4	ss-OP3:ポリ C	0.5			
9	6	ss-OP3:ceDNA-luc	0.5			最大 28 日目
10	4	ss-OP4:ポリ C	0.5			0 日目 群当たり N=2 最大 28 日目 群当たり N=4
11	6	ss-OP4:ceDNA-luc	0.5			最大 28 日目
12	2	MC3:ceDNA-luc	0.5			0 日目 群当たり N=2 最大 28 日目 群当たり N=4
13	2	ss-OP4:ceDNA-luc	0.5			1 日目
ハウジング: 群を、処置室の換気されたラックに接触床敷を備えた透明なポリカーボネートケージに収容した。				餌/水: Mouse Diet 5058 および 1N HCl で 2.5~3.0 の目標 pH に酸性化した濾過した水道水を、動物に自由摂取させた。		
a スケジュールの必要に応じて、動物を 2 つのコホート (1 群当たりに適用できる n=2 および n=4) に登録することができる。						

No.=番号、IV=静脈内、ROA=投与経路

ss-PAZ (ssPalmE-Paz4-C2)、ポリ C: ポリシチジル酸

【0372】

血液試料を、以下に概説するように、中間時点で、および研究の終わり（最終）に収集した。

10

20

30

40

50

【表 3】

表 3 : 採血 :

群番号	試料採取時間
	全血 (尾部、伏在部、または眼窩部)
	血清 ^a
1～7、9、11 群当たり 4	0 日目 試験材料投与の 6 時間後 (±5%)
12+13	0 日目 試験材料投与の 6 時間後 (±5%)
容量/分量	約 150 μ L の全血
処理/保存	1 アリコート、表示上-70°Cで凍結

^a 全血を血清分離チューブに収集し、凝固活性剤を添加した、
MOV=取得可能な最大容量

【表 4】

表 4 : 採血 (最終)

群番号	試料採取時間	
	終末	
	血清 ^a	EDTA 全血
1～7、9 および 11 (群当たり 2)	0 日目 試験材料投与の 6 時間後 (±5%)	0 日目 試験材料投与の 6 時間後 (±5%)
12 および 13		1 日目 試験材料投与の 24 時間後 (±5%)
部分	1/2MOV	1/2MOV または約 400 μ L
処理/保存	1 アリコート、表示上-70°Cで凍結	1 アリコート 4°Cで保存

^a 全血を血清分離チューブに収集し、凝固活性剤を添加した、
MOV=取得可能な最大容量

【0 3 7 3】

組織を、以下に概説するように、研究の終わり（終末）に収集した。

【表 5】

表 5：末端組織収集

群番号	試料採取時間	
	肝臓	脾臓
1～7、9 および 11 (群当たり 2)	0 日目 試験物質投与の 5～6 時間後	
12 および 13	1 日目 試験材料投与の 24 時間後 (±5%)	
容量/分量	臓器全体を秤量する 次いで分割する	臓器全体を秤量する 次いで分割する
処理	10%の NBF (EPL) で保存された肝左葉 4×25～50 mg の試験片の重さ 個別に瞬間凍結する	4×15～25 mg 試験片を秤量して、 個別に瞬間凍結する
保存	固定試料は冷蔵保存 凍結試料を表示上-70℃で保存する	

No.=数値、MOV=取得可能な最大容量、NBF=中性緩衝ホルマリン、TBD=未定

【0374】

研究の詳細は以下に記載される。到着時に約 4 週齢の C D - 1 マウスを C h a r l e s R i v e r から入手した (N = 62)。ルシフェラーゼ発現カセットを含有する c e D N A は、本明細書に記載されているように脂質ナノ粒子で提供された。ケージ側の観察を毎日実施した。臨床観察を、投与後約 1 時間、約 5～6 時間、および約 24 時間 (1 群当たりの残りの動物) に実施した。例外ごとに追加の観察を行った。すべての動物の体重を、0、1、2、3、7、14、21 および 28 日目 (安楽死前) に記録した。必要に応じて、追加の体重を記録した。c e D N A は濃縮ストック (0.5 mg/mL) で供給された。ストックを室温まで温め、使用直前に付属の P B S で希釈した。投与がすぐに実施されない場合、調製された材料を約 4℃で保存した。c e D N A を、外側尾静脈を介した静脈内投与により、群 1～13 に 0 日目に 5 mL/kg で投与した。スケジューリングの必要に応じて、動物を 2 つ以上のコホートに登録した。3、7、14 日目 (任意選択的に 21 および 28 日目) に、群 1～11 の残りの動物に、2.5 mL/kg の腹腔内 (I P) 注射により 150 mg/kg (60 mg/mL) のルシフェリンを投与した。各ルシフェリン投与後 ≤ 15 分。発光は、以下に説明するように、インビボ画像化システム (I V I S) 画像化を使用することによって得られた。各群 1～7、9 および 11 の 4 匹 (n = 4) の動物、ならびに群 12 および 13 の 2 匹 (n = 2) の動物は、0 日目に中間採血を行った。各収集後、動物は 0.5～1.0 mL の乳酸リンゲル液を皮下に受けた。血清のための全血を、尾静脈ニック、伏在静脈、または眼窩洞穿刺 (施設の S O P ごとの吸入イソフルラン下) によって収集した。全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に収集され、施設の S O P ごとの 1 つの血清アリコートに処理された。すべての試料を、分析のためにドライアイスに移すかもしくは輸送するまで、表示上 -70℃で保存した。

【0375】

投与後 5～6 時間の 0 日目に、各群 1～7、9 および 11 (群 8 および 10 ではない) の n = 2 匹の動物を、C O₂ 窒息とそれに続く開胸および放血により安楽死させた。

【0376】

取得可能な最大血液量を心臓穿刺によって収集し、次のように分割した。1/2 を凝固活性剤チューブ付きの血清分離器に収集し、施設の S O P ごとの 1 つの血清アリコートに処理した。輸送されるまで 4℃で保存された E D T A コーティングされたチューブに 1/2 を収集した。

【0377】

投与後24時間の1日目に、各群12および13の $n=2$ 匹の動物を、 CO_2 窒息とそれに続く開胸および放血により安楽死させた。取得可能な最大血液量を心臓穿刺によって収集し、次のように分割した。4℃で保存されたEDTAコーティングされたチューブに収集された約400、残りの全血は廃棄された。

【0378】

28日目に、各群($n=4$)の残りの動物を、 CO_2 窒息とそれに続く開胸または頸椎脱臼により安楽死させた。

【0379】

放血後、すべての動物は生理食塩水で心臓灌流を受けた。簡潔には、全身の心臓内灌流を、生理食塩水を含有する10mLのシリンジに取り付けられた23/21ゲージの針を、灌流のために左心室の内腔に挿入することによって実施した。灌流液のドレナージ出口を提供するために、右心房を切開した。針が心臓に位置付けられた後、動物を灌流するために、穏やかで安定した圧力をプランジャーに加えた。フラッシング溶液が体を飽和し、手順が完了したことを示す、流出する灌流液が透明に流れる(眼に見える血液がない)まで、フラッシング溶液の適切な流れを確実にした。

【0380】

終末組織を、予定された時点より前に安楽死させた瀕死の動物から収集した。可能な場合、死んでいることがわかった動物から組織を収集して保存した。安楽死および灌流の後、肝臓および脾臓を採取し、臓器全体の重量を記録した。

【0381】

肝左葉を組織学カセットに入れ、10%中性緩衝液で固定し、冷蔵(約4℃)した。10%のNBF中の組織を、アイスパック上の密閉容器で輸送されるまで冷蔵(約4℃)で維持した。

【0382】

残りの肝臓から、4×約25~50mgの切片(≤50mg)を収集し、秤量した。切片を個別に瞬間凍結し、輸送されるまで表示上-70℃で保存した。残りの肝臓はすべて廃棄した。

【0383】

脾臓から、4×約15~25mgの切片(≤25mg)を収集し、秤量した。切片を個別に瞬間凍結し、輸送されるまで表示上-70℃で保存した。残っている脾臓はすべて廃棄された。

【0384】

次に、試料中の細胞当たりの単一RNA分子を視覚化するために使用されるインサイチュハイブリダイゼーション(ISH)アッセイ法であるRNAscope LSI SHアッセイを使用して、10匹のマウス肝臓FFPE試料におけるルシフェラーゼ-04-センスのceDNA発現を評価した。

【0385】

10匹のマウス肝臓FFPE試料は、各群に2匹のマウスを有する、4つの治療群および1つのビヒクル対照で提供された)。以下のプローブ:Mm-PP1B(陽性対照)、dapB(陰性対照)、ルシフェラーゼ-04-センスを使用した。

【0386】

組織およびRNAの品質を評価し、試料セットのアッセイ条件を最適化するために、最初に陽性および陰性対照アッセイを実施し、続いて品質管理(QC)に合格した試料で標準のアッセイを実施した。

【0387】

インビボIVIS画像化プロトコル

インビボ画像化は、以下の材料および方法を使用して実行された。

【0388】

材料:ルシフェリン投与用の適切なシリンジ、ルシフェリン投与用の適切なデバイスお

10

20

30

40

50

よび／またはシリンジ、ホタルルシフェリン、PBS、pHメータまたは同等品、5 MのNaOH、5 MのHCl、K／X麻酔薬またはイソフルラン。

【0389】

手順

ルシフェリンの調製：

●ルシフェリンストック粉末を表示上-20℃で保存する。

●製剤化されたルシフェリンを1 mLのアリコート、2～8℃で保存して、光から保護する。

●製剤化されたルシフェリンは、2～8℃で最大3週間安定であり、光から保護され、室温（RT）で約12時間安定である。

●ルシフェリンをPBSに十分な容量で60 mg/mLの目標濃度に溶解し、必要に応じて5 MのNaOH（約0.5 μL/mgルシフェリン）およびHCl（約0.5 μL/mgルシフェリン）でpH=7.4に調整する。

●少なくとも50%の超過分を含め、プロトコルに従って適切な量を調製する。

注射および画像化（注：一度に最大3匹の動物をイメージングできる）

●動物の被毛を剃る（必要に応じて）。

●プロトコルに従って、腹腔内を介して60 mg/mLのPBS中の150 mg/kgのルシフェリンを注射する。

●イメージングは、投与直後または投与後最大15分実施できる。

●イメージングセッション中に動物を麻酔するために、イソフルラン気化器を1～3%（通常は2.5%において）に設定する。

●画像化セッションのためのイソフルラン麻酔：

○動物をイソフルランチャンバーに入れ、イソフルランが有効になるまで約2～3分待つ。

○IVIS機器の側面の麻酔レベルが「オン」の位置にあることを確認する。

○動物をIVIS機器に入れ、ドアを閉める

●IVISコンピューターにログインし、所望の取得プロトコルを開く。最高の感度を得るために推奨される取得設定は、Dレベルでのカメラの高さ、f1でのF/ストップ、中解像度でのピンング、および露出時間を自動にすることである。

●カメラのコントロールパネルインターフェースで「取得」を押す。

●取得したすべての画像にラベルを挿入する。画像が保存される。

【0390】

結果

図7に示すように、体重への最小限の効果が、すべての投与群のマウスで観察された。

図8は、ceDNA LNP群の各々（MC3：ポリC、MC3：ceDNA-luc、ss-Paz3：ポリC、ss-Paz3：ceDNA-luc、ss-Paz3：ceDNA-luc+dexPalm、ss-Paz4：ポリC、ss-Paz4：ceDNA-luc、ss-OP3：ポリC、ss-OP3：ceDNA-luc、ss-OP4：ポリC、ss-OP4：ceDNA-luc）におけるルシフェラーゼ活性を示すグラフである。図8に示すように、ss-OP3：ceDNA-lucおよびss-OP4：ceDNA-luc投与群では、MC3投与群と同等以上のルシフェラーゼ発現が見られたが、ss-Paz3：ceDNA-lucおよびss-Paz4：ceDNA-luc投与群では検出できなかった。図9に示すようにceDNAは、相対比は変化したが、すべての投与群で投与6時間後にqPCRによって血液、肝臓、および脾臓で検出された。

【0391】

0日目の投与後6時間でのマウスの血清中のサイトカインおよびケモカインレベル（pg/mL）に対するLNP中のSSシリーズ脂質の効果を図10Aおよび図10Bに示す。インターフェロンアルファ（IFNα）、インターフェロンガンマ（IFNγ）、インターロイキン（IL）-18、IL-6、腫瘍壊死因子アルファ（TNFα）、インターフェロンガンマ誘導タンパク質10（IP-10、CXCL10としても知られる）、単

10

20

30

40

50

球化学誘引物質タンパク質-1 (MCP-1/CCl2)、マクロファージ炎症性タンパク質 (MIP) 1 α およびMIP 1 β のレベル、ならびに活性化で調節される正常なT細胞の発現および分泌 (RANTES) が決定された。図10Aおよび図10Bに示すように、サイトカインレベルは、MC3: ceDNA-luc投与群と比較して、SSシリーズ: ceDNA-luc投与群で有意に低かったが、対応する陰性対照ポリC投与群よりも依然として高かった。パルミチン酸デキサメタゾン (DexPalm) は、いくつかのサイトカインをさらに低減させた。

【0392】

MC3群と比較して、ss-OP4 LNPで処理されたマウスは、24時間で肝臓のコピー数が100分の1になり (図9)、同等以上のルシフェラーゼ発現 (図11) およびサイトカイン放出の低下 (図10Aおよび10B) を達成した。さらに、これらの研究は、ceDNAおよびss-脂質と組み合わせて使用した場合のサイトカイン応答に対するLNP製剤中のパルミチン酸デキサメタゾンの有益な効果も明らかにした。

【0393】

まとめると、結果は、ss-OP4がMC3を上回り、ss-OP4 LNP製剤は、MC3 LNP製剤と比較して同等レベルのceDNA発現を維持しながら、ceDNAのコピー数が少ないことを示す。さらに、ss-OP4 LNPは、MC3 LNPと比較して有意に低減したサイトカイン放出を示し、ceDNA-ss-OP4 LNPが炎症性免疫応答の緩和にプラスの影響を及ぼしたことを示す。

【0394】

実施例8: CD-1マウスにおけるceDNAのLNP製剤の評価

以下の研究を、マウスのGalNAcと組み合わせて使用するSS切断可能脂質を含有するLNPを評価するために実行した。

【0395】

例示的な脂質ナノ粒子製剤を、実施例6に従って調製し、インビボで試験した。簡単に説明すると、ss-OP4を、ss-OP (式I)、DOPC、コレステロール、DMG-PEG2000、およびモル比50%:10%:38%:1.5%:0.5%のGalNAcを使用して調製した。研究デザインを以下の表6~7に以下に概説する。

【表6】

表6: 試験材料投与コホートA

群番号	群当たりの動物	治療	用量レベル (mg/kg)	投与量 (mL/kg)	治療レジメン	終末時点
1	4	PBS	該当せず	5	0日目に1回、静脈内	21日目
2	4	ss-OP4:ceDNA-luc	0.5			
3	4	ss-OP4:ceDNA-luc	2.0			
4	4	ss-OP4/GalNAc:ceDNA-luc	0.5			
5	4	ss-OP4/GalNAc:ceDNA-luc	2.0			

No.=番号、IV=静脈内、ROA=投与経路

【表 7】

表 7：試験材料投与コホート B

群番号	群当たり の動物	治療	用量レベル (mg/kg)	投与量 (mL/kg)	治療レジメン	終末時点
1b	2	PBS	該当せず	5	0 日目に 1 回、静脈内	1 日目
2b	2	ss-OP4:ceDNA-luc	0.5			
3b	2	ss-OP4:ceDNA-luc	2.0			
4b	2	ss-OP4/GalNAc:ceDNA-luc	0.5			
5b	2	ss-OP4/GalNAc:ceDNA-luc	2.0			

No.=番号、IV=静脈内、ROA=投与経路

【0396】

研究の詳細は以下に記載される。

【0397】

種（数、性別、年齢）：CD-1 マウス（N = 62 および 4 匹の予備、雄、到着時に約 4 週齢まで）は Charles River Laboratories から入手した。

【0398】

化合物のクラス：ceDNA は、本明細書に記載されているように脂質ナノ粒子で提供された。

【0399】

ケージ側の観察：ケージ側の観察を毎日実施した。

【0400】

臨床観察：臨床観察は、0 日目の試験材料投与の約 1、約 5～6、および約 24 時間後に実施された。例外ごとに追加の観察を行った。

【0401】

体重：すべての動物の体重を、該当する場合、0、1、2、3、4、7、14、および 21 日目（安楽死前）に記録した。必要に応じて、追加の体重を記録した。

【0402】

前処置および試験材料の用量処方：前処置および試験品は、濃縮ストックで供給された。ストックを室温まで温め、使用直前に付属の PBS で希釈した。投与がすぐに実施されない場合、調製された材料を約 4℃で保存した。

【0403】

用量投与：試験品を、外側尾静脈を介した静脈内投与により、群 1～5 に 0 日目に 5 mL/kg で投与した。コホート A および B は、0 日目の日付が異なる場合がある。

【0404】

インライフ画像化：4、7、14 および 21 日目に、群 1～5、コホート A の動物に、2.5 mL/kg の腹腔内（IP）注射により 150 mg/kg（60 mg/mL）のルシフェリンを投与した。各ルシフェリン投与後 ≤ 15 分。発光は、インビボ画像化システム（IVIS）画像化を使用することによって得られた。

【0405】

麻酔の回復：麻酔下の間、回復中、および移動するまで、動物を継続的にモニタリングした。

【0406】

中間採血：群 1～5、コホート A のみのすべての動物は、0 日目、試験材料投与の 6 時間後（±5%）に中間採血を行った。収集後、動物は、0.5～1.0 mL の乳酸リンゲル液を皮下投与された。血清のための全血を、尾静脈ニック、伏在静脈、または眼窩洞穿刺（吸入イソフルラン下）によって収集した。全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に収集され、1 つの血清アリコートに処理された。すべての試料を、分析のために

輸送されるまで、表示上－70℃で保存した。

【0407】

安楽死および終末収集：投与後24時間（±5%）の1日目に、各群1～7のn=2匹の動物コホートBについて、CO₂窒息とそれに続く開胸および放血により安楽死させた。血液をEDTAコーティングされたチューブに入れ、全血（処理済みまたは未処理）を輸送されるまで冷蔵保存した。

【0408】

灌流：放血後、すべての動物は生理食塩水で心臓灌流を受けた。簡潔には、全身の心臓内灌流を、生理食塩水を含む10mLのシリンジに取り付けられた23/21ゲージの針を、灌流のために左心室の内腔に挿入することによって行った。灌流液のドレナージ出口を提供するために、右心房を切開した。針が心臓に位置付けられた後、動物を灌流するために、穏やかで安定した圧力をプランジャーに加えた。フラッシング溶液が体を飽和し、手順が完了したことを示す、流出する灌流液が透明に流れる（目に見える血液がない）まで、フラッシング溶液の適切な流れを確実にした。

【0409】

組織収集：終末組織を、予定された時点より前に、コホートBの安楽死させた瀕死の動物から採取した。可能な場合、死んでいることがわかった動物から組織を収集して保存した。安楽死および灌流の後、肝臓、脾臓、腎臓、および両方の肺を採取し、臓器全体の重量を記録した。

【0410】

肝左葉を組織学カセットに入れ、10%中性緩衝液で固定し、冷蔵（約4℃）した。10%のNBF中の組織を、アイスパック上の密閉容器で輸送されるまで冷蔵（約4℃）で維持した。

【0411】

残りの肝臓から、4×約25～50mgの切片（≤50mg）を収集し、秤量した。切片を個別に瞬間凍結し、輸送されるまで表示上－70℃で保存した。残りの肝臓はすべて廃棄した。

【0412】

左腎臓から、4×約15～25mgの切片（≤25mg）を収集し、秤量した。切片を個別に瞬間凍結し、輸送されるまで表示上－70℃で保存した。残りの腎臓はすべて廃棄した。

【0413】

脾臓から、4×約15～25mgの切片（≤25mg）を収集し、秤量した。切片を個別に瞬間凍結し、輸送されるまで表示上－70℃で保存した。残りの脾臓はすべて廃棄した。

【0414】

肺から、4×約15～25mgの切片（≤25mg）（各肺から2片）を収集し、秤量した。切片を個別に瞬間凍結し、輸送されるまで表示上－70℃で保存した。残りの肺はすべて廃棄した。

【0415】

21日目に、コホートAの動物を、CO₂窒息とそれに続く開胸または頸椎脱臼により安楽死させた。組織は収集されなかった。

【0416】

結果：ss-OP4-ceDNA処理マウス（0.5および2.0mg/kgの用量）は、長期にわたる有意な蛍光を示し、したがって、副作用を示すことなくルシフェラーゼ導入遺伝子の発現を示した。研究を通して、マウスは図12Aに示されるように体重増加を示し続けた。図12Bおよび13に示されるように、ss-OP4-ceDNA製剤中のGalNAcの存在（ss-OP4：Gのように、LNPの総重量に対するモル比でのGalNAcの0.5%）は、ceDNA-lucの発現レベルを増加させ、IFNα、IFNγ、IL-18、IL-6、IP-10および／またはTNF-αの放出を低減す

10

20

30

40

50

ることによって、炎症誘発性応答を軽減した。このデータは、ss-OP4で製剤化されたceDNAを、GalNAc受容体を発現する特定の組織（肝臓など）に標的化すると、標的化効率が向上し、炎症応答を移行しながらceDNA発現が増強されることを示唆する。

【0417】

実施例9：CD-1マウスにおけるceDNAのLNP製剤の評価

以下の研究を、マウスのSS切断可能脂質を含有するLNPを評価するために実行した。本明細書に記載されるように、SSシリーズ脂質は、細胞内環境に応答できる二重感知モチーフを含有し、三級アミンは、膜不安定化のための酸性区画（エンドソーム／リソソーム）、および還元環境（細胞質）で切断できるジスルフィド結合に応答する。例示的な脂質ナノ粒子製剤を、実施例6に従って調製し、インビボで試験した。

【0418】

研究デザインを以下の表8に概説する。

【表8】

表8

群番号	#群当たりの動物	試験材料	用量レベル (mg/kg)	投与量 (mL/kg)	治療レジメン、 ROA	終末時点
1	4	MC3:ceDNA-luc	0.5	0日目に静脈内で1回	56日目	
2	4	ss-OP4	0.5			
3	4	ss-OP4:ceDNA-luc	0.1			
4	4	ss-OP4:ceDNA-luc	0.5			
5	4	ss-OP4:ceDNA-luc+DexP	0.1			
6	4	ss-OP4:ceDNA-luc+DexP	0.5			
7	4	ss-OP4:ceDNA-luc+DexP	1.0			
8	4	ss-OP4:ceDNA-luc+DexP	2.0または 0.75	静脈内で1 回5	1日目	
試験品の保存 (ストック製剤): 試験品を、スポンサーから濃縮ストック (0.5 mg/mL) で提供され、使用するまで表示上 4°Cで保存する。			残留試験品を表示上 4°Cで保存する。			
ハウジング: 群を、処置室の換気されたラックに接触床敷を備えた透明なポリカーボネートケージに収容した。			餌/水: Mouse Diet 5058 および 1N HCl で 2.5~3.0 の目標 pH に酸性化した濾過した水道水を、動物に自由摂取させる。			

No.=番号、IV=静脈内、ROA=投与経路

【0419】

血液試料（中間血液試料を含む）は、以下の表9および10に概説されているように収集された。

【表 9】

表 9

群番号	試料採取時間	
	全血 (尾部、伏在部、または眼窩部)	
	血清	
1～7	0 日目 試験材料投与の 6 時間後 (±5%)	1 日目 試験材料投与の 24 時間後 (±5%)
8	1 日目 試験材料投与の 6 時間後 (±5%)	2 日目 試験物質投与の 24 時間後 (±5%)
容量/部分	約 150 μ l の全血	50 μ l、全血 (インビトロ)
処理/保存	1 アリコート、表示上-70°Cで凍結	

10

【表 10】

表 10

	試料目的	DO/1 (6 時間)	DI/2 (24 時間)
容量 (mL) 全血	サイトカイン	0.15 mL	
	ALT/AST		0.05 mL
	合計/日 (mL)	0.15 mL	0.05 mL

20

【0420】

研究の詳細は以下に記載される。

【0421】

種 (数、性別、年齢) : CD-1 マウス (N=62 および 4 匹の予備、雄、到着時に約 4 週齢まで) は Charles River Laboratories から入手した。

【0422】

化合物のクラス : cedNA は、本明細書に記載されているように脂質ナノ粒子で提供された。

30

【0423】

ケージ側の観察 : ケージ側の観察を毎日実施した。

【0424】

臨床観察 : 臨床観察は、0 日目の試験材料投与の約 1、約 5～6、および約 24 時間後に実施された。例外ごとに追加の観察を行った。

【0425】

体重 : すべての動物の体重を、該当する場合、0、1、2、3、4、7、14、21、28、35、42、49 および 56 日目 (安楽死前) に記録した。必要に応じて、追加の体重を記録した。

40

【0426】

試験材料の用量処方 : 試験品は、濃縮ストック (0.5 mg/mL) で供給された。ストックを室温まで温め、使用直前に付属の PBS で希釈した。投与がすぐに実施されない場合、調製された材料を -4°C で保存した。

【0427】

用量投与 : 群 1～7 の試験品を、外側尾静脈を介した静脈内投与により、0 日目に 5 mL/kg で投与した。群 8 の試験品を、外側尾静脈を介した静脈内投与により、1 日目に 5 mL/kg で投与した。2.0 mg/kg または 0.75 mg/kg の用量レベルは、群 7 の 6 時間および 24 時間の臨床観察後に決定された。任意の副作用が見られる場合は

50

、低用量を投与した。

【0428】

インライフ画像化：7、14、21、28、35、42、49および56日目に、群1～8の動物に、2.5 mL/kgの腹腔内（IP）注射により150 mg/kg（60 mg/mL）のルシフェリンを投与した。各ルシフェリン投与後<15分。発光は、実施例7に説明するように、インビボ画像化システム（IVIS）画像化を使用することによって得られた。

【0429】

麻酔の回復：麻酔下の間、回復中、および移動するまで、動物を継続的にモニタリングした。

【0430】

採血：すべての動物は、上記の表の試料収集表ごとに、0日目および1日目ならびに1日目および2日目に採血された。各収集後、動物は0.5～1.0 mLの乳酸リンゲル液を皮下に受けた。

【0431】

血清のための全血を、尾静脈ニック、伏在静脈、または眼窩洞穿刺（施設のSOPごとの吸入イソフルラン下）によって収集した。全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に収集され、施設のSOPごとに1つの血清アリコートに処理された。

【0432】

すべての試料を表示上-70℃で保存した。

【0433】

1/2日目の試料は、ELISAによるALT/ASTの試験施設によって分析された。

【0434】

安楽死：56日目に、動物を、CO2窒息とそれに続く開胸または頸椎脱臼により安楽死させた。組織は収集されなかった。

【0435】

報告：この研究のためにデータ報告が発行された。項目には、IVISデータ、体重の個体および群の平均（該当する場合）、動物ごとに投与されるTAの容量、用量投与時間、試料の収集および安楽死、臨床観察（該当する場合）および死亡率（該当する場合）が含まれる。

【0436】

結果：体重への最小限の効果が、すべての投与群のマウスで観察された（データは示さず）。ss-OP4 LNPは、MC3 LNPと比較して低減したサイトカイン放出を示し、ceDNA-ss-OP4 LNPが炎症性免疫応答の緩和にプラスの影響を及ぼしたことを示す（データは示さず）。パルミチン酸デキサメタゾン（DexPalm）は、DexPalmで試験したすべての群において、いくつかのサイトカインをさらに低減させた。ss-OP4:ceDNA-luc投与群では、MC3投与群と同等以上のルシフェラーゼ発現であった（データは示さず）。

【0437】

実施例10：雄CD-1マウスにおける投与経路によるceDNA LNP製剤の評価

以下の研究を、静脈内（IV）または皮下（SC）注射によって投与されたマウスのSS切断可能脂質を含有するLNPを評価するために実行した。

【0438】

簡単に説明すると、ceDNA-lucは、ss-OP4切断可能脂質またはMC3を含有するLNPで製剤化された。上記のように、ss-OP4 LNPは、ss-OP、DOPC、コレステロール、およびPEG-DMGの4つの異なる脂質成分を有する。以下の表11に示す製剤を調製し、試験した。

10

20

30

40

50

【表 1 1】

表 11.

LNP	組成	モル比				
MC3	MC3:DSPC:Chol:DMG-PEG2000	50.0	10.0	38.5	1.5	
ss-OP4/G_第 1 世代	SS-OP:DOPC:Chol:DMG-PEG2000:DSPE-PEG-GalNAc ₄	50.7	7.3	38.6	2.9	0.5
ss-OP4/G_N/P-10+β-シトステロール+リンゴ酸	SS-OP:DOPC:β-シトステロール:DMG-PEG2000:DSPE-PEG-GalNAc ₄	50.7	7.3	38.6	2.9	0.5

10

【 0 4 3 9】

N/P-10は、SS-OPのアミノ基対ceDNAのホスホ基の比率である。β-シトステロール（sito）はコレステロール類似体である。リンゴ酸は、エタノール中の脂質溶液と混合する前のceDNAの緩衝液である。ss-OP4は、ss-OP4の数値であり、Gは、GalNAcを表す。

【 0 4 4 0】

研究デザインを以下の表 1 2 に概説する。

20

30

40

50

【表 1 2】

群番号	群当たりの動物	治療	用量レベル (mg/kg)	投与量 (mL/kg)	治療レジメン	終末時点
1	6	MC3	0.5	5	0 日目に 1 回、 静脈内	1 日目*または 28 日目
2	6	ss-OP4/GalNAc_第 1 世代				
3	6	ss-OP4/GalNAc_N/P-10+β-シトステロール+ リンゴ酸			0 日目に 1 回、 ゆっくりと静脈内	
4	6	ss-OP4/GalNAc_第 1 世代				
5	6	空の			0 日目に 1 回、 皮下	
6	6	MC3				
7	6	ss-OP4/GalNAc_第 1 世代				
8	6	ssOP4/GalNAc_N/P-10+β-シトステロール+ リンゴ酸 (第 2 世代)				

【0 4 4 1】

血液試料は、以下の表 1 3 (中間採血) および表 1 4 (最終採血) に概説されているように収集された。

10

20

30

40

50

【表 1 3】

表 13

群番号	試料採取時間
	全血 (尾部、伏在部、または眼窩部)
	血清 ^a
1～8 群当たり n=4 のみ	0 日目 試験材料投与の 6 時間後 (±5%)
容量/分量	約 150 μL の全血
処理/保存	1 アリコート、表示上-70℃で凍結

^a 全血を血清分離チューブに収集し、凝固活性剤を添加した

【表 1 4】

表 14

群番号	試料採取時間
	終末
	全血
群当たり N=2	1 日目 試験材料投与の 24 時間後 (±5%)
群当たり N=4	28 日目
部分	MOV
処理/保存	EDTA 処理せず/凍結せず 5℃±3℃

MOV=取得可能な最大容量

【0 4 4 2】

以下の表 1 5 に概説するように末端組織を収集した。

10

20

30

40

50

【表 15】

表 15.

群番号	試料採取時間					
	肝臓	腎臓 (両方)	脾臓	肺 (両方)	注射部位 群 5～8	未処置の皮膚 群 5～8
群当たり N=2	1 日目 試験材料投与の 24 時間後 (±5%)					
群当たり N=4	28 日目					
容量/分量	臓器全体を秤量する 次いで分割する				肩甲骨内皮膚の マークされた部 分、剃毛	背側のしわの 皮膚の等しい 部分、剃毛
処理	10%の NBF (EPL) で保存さ れた肝左葉		10%の NBF (EPL) に保存さ れた 1/3 脾臓		10%の NBF (EPL) のスポンジを 有するカセットに平らに置く	
	秤量された 4×25～50 mg の試験片を個別に瞬間凍 結する (Lake Pharma)		4×15～25 mg 試験片を秤 量して、個別に瞬間凍結 する (Lake Pharma)			
保存	固定試料は冷蔵保存 凍結試料を表示上-70℃で保存する				固定試料は冷蔵保存	

No.=番号

【0443】

研究の詳細は以下に記載される。

【0444】

種（数、性別、年齢）：CD-1 マウス（N=48 および 4 匹の予備、雄、到着時に約 4 週齢まで）は Charles River Laboratories から入手した。

【0445】

化合物のクラス：ceDNA は、本明細書に記載されているように脂質ナノ粒子で提供された。

【0446】

ケージ側の観察：ケージ側の観察を毎日行った。

【0447】

臨床観察：臨床観察は、0 日目の試験材料投与の約 1、約 5～6、および約 24 時間後に実施された。例外ごとに追加の観察を行った。

【0448】

体重：すべての動物の体重を、該当する場合、0、1、2、3、4、7、14、21、28、35、42、49 および 56 日目（安楽死前）に記録した。必要に応じて、追加の体重を記録した。

【0449】

試験材料の用量処方：試験品は、濃縮ストック（0.5 mg/mL）で供給された。ストックを室温まで温め、使用直前に付属の PBS で希釈した。投与がすぐに行われない場合、調製された材料を -4℃ で保存した。

【0450】

用量投与 IV：試験品は 0 日目に 5 mL/kg で、群 1～4 の群 1～3 に側尾静脈を介した静脈内ボラス投与により、群 4 に外側尾静脈を介したシリンジポンプによる SLO

W投与により45秒以上投与した。

【0451】

皮下注射部位の準備：0日目の用量投与の前に、群5～8の動物を吸入イソフルランで麻酔して効果を発揮させ、肩甲骨内領域の毛を剃った。動物がIVIS画像化のために麻酔されている間、少なくとも週に1回、部位が再剃毛された。

【0452】

用量投与SC：麻酔をかけながら、肩甲骨内領域に皮下投与することにより、群5～8の0日目に5mL/kgで試験品を投与した。

【0453】

消えないインクで、注射材料の領域の皮膚をマークする。その部位は、剖検まで必要に応じて再度マークされる。

【0454】

インライフ画像化：3、7、14、21および28日目に、群1～8の残りの動物に、2.5mL/kgの腹腔内(IP)注射により150mg/kg(60mg/mL)のルシフェリンを投与した。各ルシフェリン投与後≤15分。発光は、実施例7に説明するように、インビボ画像化システム(IVIS)画像化を使用することによって得られた。

【0455】

麻酔の回復：麻酔下の間、回復中、および移動するまで、動物を継続的にモニタリングした。

【0456】

採血：群1～8の各群4匹の動物のみ、0日目、試験材料投与の6時間後(±5%)に中間採血を行った。採取後、動物は0.5～1.0mLの乳酸リンゲル液を皮下に受けた。

【0457】

血清のための全血を、尾静脈ニック、伏在静脈、または眼窩洞穿刺(施設のSOPごとの吸入イソフルラン下)によって収集した。全血は、凝固活性剤チューブを備えた血清分離器に収集され、施設のSOPごとに1つの血清アリコートに処理された。

【0458】

すべての試料を表示上-70℃で保存した。

【0459】

結果：図26に示すように、静脈内投与(IV)したMC3またはss-OP4-ceDNAで処理されたマウスは、長期にわたる有意な蛍光、したがってルシフェラーゼ導入遺伝子の発現を示した。さらに、ss-OP4:ceDNA-luc静脈内投与群では、MC3静脈内投与群と同等以上のルシフェラーゼ発現であった。比較すると、皮下(SC)投与されたMC3またはss-OP4-ceDNAで処理されたマウスは、有意な蛍光を示さなかった。さらに、図27に示すように、静脈内または皮下のいずれかで投与されたss-OP4-ceDNA製剤は、IFNα、IFNγ、IL-18、IL-6、IP-10および/またはTNF-αの放出を低減させることによって炎症誘発性応答を軽減した。

【0460】

実施例11：非ヒト霊長類におけるceDNA LNP製剤の評価

以下の研究は、雄のカニクイザルに70分間静脈内注入した後、GalNAcと組み合わせるSS切断可能脂質を含有するceDNA LNPの忍容性を評価するために実施した。因子IXを保有するceDNAを含む例示的な脂質ナノ粒子(LNP)製剤を、実施例6に従って調製し、インビボで試験した。LNP製剤番号1および2は、標準的な切断不可能なカチオン性脂質であった。LNP製剤#3は、ss-OP4+GalNAcであった。上記のように、ss-OP4の数字の4は、LNP製剤の全脂質成分を表す。例えば、ss-OP4 LNPは、表1の脂質ナノ粒子6のようにモル比がそれぞれ約51:7:39:3のss-OP、DOPC、コレステロール、およびPEG-DMGの4つの異なる脂質成分を有する。

【0461】

すべての群のすべての動物は、投与の開始前にジフェンヒドラミンおよびデキサメタゾンを投与された。LNP製剤#1、2、または3は、約70分間の静脈内注入によって投与された。エンドポイントには、サイトカイン分析、補体分析、肝酵素（AST、ALT）の分析、凝固および抗PEG IgG/IgMが含まれていた。研究デザインを以下の表16に概説する。

【表16】

群番号	動物の数	前処置	試験材料	用量レベル (mg/kg/用量)	濃度 (mg/mL)	投与量 (mL/kg)	投与経路/レジメン	生検およびサンプリング 時点
1	1	DPH および Dex 30分 投与前	LNP 製剤#1 切断不可能な LNP:ceDNA-hFIX	0.01	0.002	5	0 日目に 70 分間の静脈内注入 最初の 15 分間の注入速度: 0.415 mL/kg 残りの 55 分間の注入速度: 4.585 mL/kg	採血: 投与前、注入終了 後 15 分、6 時間および 24 時間
2	1		LNP 製剤#1 切断不可能な LNP:ceDNA-hFIX	0.05	0.01			
3	1		LNP 製剤#1 切断不可能な LNP:ceDNA-hFIX	0.1	0.02			
4	1	DPH および Dex 30 分間 投与前	LNP 製剤#2 切断不可能な LNP:ceDNA-hFIX	0.1	0.02			肝臓および脾臓の Bx:24 時間 採血: 投与前、投与後 15 分、6 時間および 24 時間
5	1	投与の 30 分前の DPH および Dex	LNP 製剤#3 ss-OP4-GalNac:ceDNA-hFIX	0.05	0.01			

Gr.=群、No.=番号、An.=動物、Conc.=濃度、DPH=ジフェンヒドラミン、Dex=デキサメタゾン、LNP=脂質ナノ粒子

【0462】

投与製剤

デキサメタゾンおよびジフェンヒドラミンをストック濃度で使用した。経口胃管栄養懸濁液の粒子を分配するために、投与前に製剤を混合（ピペッティングまたは攪拌）した。

試験品は以下のように提供された。LNP製剤#1は、0.5 mg/mLの滅菌ストック溶液として提供され、LNP製剤#2は、1 mg/mLの滅菌ストック溶液として提供され、LNP製剤#3は、1 mg/mLの滅菌ストック溶液として提供された。投与当日、試験品を冷蔵庫から取り出し、室温に戻した。試験濃度を達成するために、投与前にストック溶液を希釈した。

【0463】

動物

2～4歳、体重約2.0～3.5 kgの雄のMacaca fascicularis カニクイザル（中国産）8匹を使用した。サルはすべて未処置であった。すべての動物は、試験施設のIACUCガイドラインおよびSOPに従って、隔離および順応され、検疫から解放された後の適切な時期に研究に割り当てられた。動物は、温度64°F～84°F、湿度30%～70%、光サイクル12時間明暗（指定処置時を除く）で、研究期間中、ペアまたは単独で集団飼育された。

【0464】

研究動物には、Monkey Diet 5038（Lab Diet）を毎日与えた。心理的／環境的エンリッチメントのために、研究処置／活動中を除いて、止まり木、採餌デバイス、吊り下げデバイスなどのアイテムを動物に提供した。音楽などの追加のエンリッチメントも提供された。絶食時を除いて、各動物には栄養補助食品（認定されたおやつ、新鮮な果物、Prima Foraging Crumbles（登録商標）など）が提供された。動物は、肝臓および脾臓の生検手順について以下に記載されるように麻酔された。研究の終わりに、すべての動物はコロニーに戻された。

【0465】

投与経路および用量レベル

投与経路は、ヒトで予想される曝露に基づいて選択された。用量レベルは、以前の非ヒト霊長類研究およびマウスにおける対応する用量レベルに基づいて選択された。0.01 mg/kgの初期用量レベルは以前に投与されたものより50倍低かった。群1、2、および3の結果に基づいて、試験品および用量レベルは、以前に投与されたものの5分の1である0.1 mg/kgの用量までエスカレーション方式で割り当てられた。

【0466】

前処置：すべての群の動物に、投与開始30分前（±3分）にジフェンヒドラミン（5 mg/kgを静脈内または筋肉内）およびデキサメタゾン（1 mg/kg、静脈内または筋肉内）を投与した。

【0467】

試験品の注入：試験品は、約70分間にわたって拘束された動物に静脈内注入によって投与された。用量は、一時的な静脈内カテーテルを用いて伏在静脈または橈側皮静脈のいずれかを介して投与された。投与の最後に、カテーテルを0.5 mLの生理食塩水で洗い流した。投与量は、最新の体重に基づいて計算され、0.1 mL単位で四捨五入される。静脈内投与注入の終了時間を使用して、血液試料および生検収集時点の目標時間を決定した。注射部位、投与開始時間および終了時間は生データに記録された。

【0468】

インライフ観察および測定

動物の健康チェックは少なくとも1日2回行われ、すべての動物の一般的な健康、行動、外観がチェックされた。体重は、1日目または0日目の投与前に記録された。重量は、0.1 kg単位で四捨五入される。臨床観察は、投与開始前の0日目に、少なくとも投与中に1回、投与の完了後に1回、および1日目の肝臓および脾臓の生検の前に記録された。必要に応じて、追加の観察結果が記録された。

【0469】

試料収集：血液試料は、適切な末梢静脈（投与に使用された静脈ではない）から収集された。

【0470】

10

20

30

40

50

サイトカイン分析のための全血：全血試料は、末梢静脈からSSTチューブへの直接針穿刺によって収集され、検査施設SOPに従って血清用に処理された。血清試料を、分析のために輸送されるまで -80°C で保存した。補体分析：サイトカイン分析のための全血：全血試料は、末梢静脈からK₂EDTAチューブへの直接針穿刺によって収集され、検査施設SOPに従って血漿用に処理された。血漿試料を、分析のために輸送されるまで -80°C で保存した。

【0471】

抗PEG IgG/IgM分析：全血試料は、末梢静脈からSSTチューブへの直接針穿刺によって収集され、検査施設SOPに従って血清用に処理された。血清試料を、分析のために輸送されるまで -80°C で保存した。

【0472】

肝酵素分析：全血試料は、末梢静脈からSSTチューブへの直接針穿刺によって収集され、検査施設SOPに従って血清用に処理された。血清試料は、IDEXX Catalystアナライザーを使用してALTおよびASTの試験施設研究所によって分析された。

【0473】

凝固分析：サイトカイン分析のための全血：全血試料は、末梢静脈からクエン酸ナトリウムチューブへの直接針穿刺によって収集され、検査施設SOPに従って血漿用に処理された。試料を、PTT、aPTTおよびフィブリノーゲンの分析のために移されるまで -80°C で保存した。

【0474】

肝臓および脾臓の生検

肝臓および脾臓の生検は、投与の最終段階での最高用量からのみ収集された。

【0475】

生検試料の取り扱い：肝臓および脾臓の生検は完全に維持され、10%中性緩衝液を含むラベル付きチューブに入れられ、冷蔵された（約 4°C ）。10%のNBF中の組織を、処理のためにアイスパック上の密閉容器で輸送されるまで冷蔵（約 4°C ）した。

【0476】

結果

ceDNA-h因子IX (hFIX) を含有するLNP中のGalNAcを有するss-OP4脂質（例えば、ss-OP、DOPC、コレステロール、PEG-DMG、それぞれ約モル比51:7:39:3）の補体経路への効果を、同様のceDNA-hFIXを保有する他の標準的切断不可能な脂質と比較した。標準の切断不可能なLNP（製剤番号1および2）を投与したサルおよびss-OP4脂質、GalNAcおよびceDNA-hFIXを含む標的LNP（製剤番号3）を投与したサルにおいて、補体成分3の切断によって形成されるタンパク質の1つであるC3aのレベル（pg/mL）および補体活性化最終生成物であるC5b9ノレベル（pg/mL）を評価した。分析用の試料は、0日目の投与前、投与後6時間、および投与後24時間に採取された。図19に示されるように、C3aおよびC5b9のレベルは、標準的なLNPで処理された動物と比較して、ss-OP4-GalNAcc LNPで処理された動物において有意に低かった。LNP投与の24時間後に劇的な違いが観察され、標準LNPで処理された動物のC3aおよびC5b9のレベルは、標準LNPで処理された動物よりもはるかに高かった。図19に示されるように、C5b9のレベルは、標準的なLNPで処理された動物において、24時間後の定量化の上限を超えていた。このデータは、LNP中にGalNAcを含む、それぞれおよそ51:7:39:3のモル比でのss-OP、DOPC、コレステロール、およびPEG-DMGを含む標的LNPは、補体応答の観点からceDNAと組み合わせて使用すると安全性プロファイルが改善されていることを示す。

【0477】

0日目の投与後6時間および24時間での投与前のマウスの血清中のサイトカインレベル（pg/mL）に対するLNP中のGalNAcと組み合わせて使用されるss-OP4脂質の効果を図20～23に示す。インターフェロンアルファ（IFN α ）およびイン

10

20

30

40

50

ターフェロンアルファ（ $IFN\alpha$ ）（図20）、インターフェロンガンマ（ $IFN\gamma$ ）およびインターロイキン-1ベータ（ $IL-1\beta$ ）（図21）、 $IL-6$ および $IL-18$ （図22）および腫瘍壊死因子アルファ（ $TNF\alpha$ ）（図23）のレベルは、ある範囲の用量（ 0.01mg/kg 、 0.05mg/kg 、 0.1mg/kg 、 0.5mg/kg ）にわたって決定された。図20～23に示すように、サイトカインレベルは、標準のLNP： $ceDNA-hFIX$ 投与群と比較して、 $ss-OP4+GalNac:ceDNA-hFIX$ 投与群で有意に低かった。

【0478】

まとめると、結果は、 $GalNac$ を含む $ss-OP4$ で製剤化した外因性DNA（例えば、第IX因子）を保有する $ceDNA$ は、補体および炎症性サイトカイン応答に関し

10

【0479】

実施例12：ラットモデルに網膜下に注射された $ceDNA$ LNP製剤の安全性および導入遺伝子発現の評価

カチオン性脂質成分として、 $ssOP4$ 製剤化ホタルルシフェラーゼ（ $fluc$ ）mRNAまたは $ssOP4$ 製剤化 $ceDNA$ 発現ルシフェラーゼ（ CpG ハ最小化）を含む $ceDNA$ 脂質ナノ粒子（LNP）製剤を使用して、両眼に網膜下注射した後の網膜における導入遺伝子発現の安全性および量を決定するために、インビボ研究を実施した。

【0480】

例示的な脂質ナノ粒子製剤を、実施例6に従って調製し、ラットモデルにおいてインビボで試験した。雄のSprague Dawleyラットを6つの研究群に分け、1群当たり5匹とした。すべての動物は、Powered Research Standard Operating Procedures（SOP）に従って研究群に割り当てられた。すべての動物は、腹腔内（IP）投与経路により、 0.5mg/kg のメチルプレドニゾロンを事前投与された。投与は両眼に網膜下注射によるものであった（OD＝右眼およびOS＝左眼）。

20

【0481】

研究デザインを以下の表17に概説する。

【表17】

表 17.

30

群	OS Tx	OS 投与量 (ug または vg)	容量 (ul)	OD Tx	OD 投与量 (ug または vg)	容量 (ul)
1	未処置	0	該当せず	ビヒクル	0	2.5
2	$ss-OP4/Luc\ mRNA$	0.6	2.5	$ss-OP4/Luc\ mRNA$	0.6	2.5
3	$ss-OP4/Luc\ mRNA$	0.2	2.5	$ss-OP4/Luc\ mRNA$	0.2	2.5
4	$ss-OP4/ceDNA-luc$	0.6	2.5	$ss-OP4/ceDNA-luc$	0.6	2.5
5	$ss-OP4/Me\ ceDNA-luc$	0.6	2.5	$ss-OP4/Me\ ceDNA-luc$	0.6	2.5

40

【0482】

研究の詳細は以下に記載される。

【0483】

Sprague Dawleyラット（ $N=30$ および2スペア、雄、生後7～8週、初回投与時の体重 $150\sim200\text{g}$ ）は、Charles River Laboratoriesから入手した。動物の死亡率および罹患率を毎日観察した。すべての動物の体重は、ベースライン（投与前）および剖検時に記録された。

【0484】

治療：雄のSprague Dawleyラットに、 0.6ug の $ss-OP4$ 製剤

50

化ホタルルシフェラーゼ (f L u c) m R N A (N1-メチル-シュードウリジン修飾)、s s-OP4 製剤化 c e D N A-l u c (A D V M-L u c c e D N A、C A G-f L u c 発現カセットをコードする c e D N A) を、右眼および左眼の両方で網膜下 (s u b R) に注射した。未処理群は対照となった。

【0485】

外科的処置：外科的処置の日に、ラットにブプレノルフィン 0.01~0.05 mg/kg を皮下 (S Q) 投与した。動物はまた、トロピカミド (1.0%) およびフェニレフリン (2.5%) のカクテルを局所的に与えられ、眼を拡張して眼球突出させた。次いで、ケタミン/キシラジンカクテルを用いて外科的処置のために動物を静置し、0.5% プロパラカイン H C L を 1 滴両眼に適用した。無菌処置のために眼を調製した。あるいは、ラットを吸入イソフルランで鎮静化した。角膜は局所洗眼器を使用して湿らせたままにし、体温は必要に応じてホットパッドを使用して維持した。強膜を露出させるために、結膜およびテノン囊を通る長さ 2 mm の切開を行った。後強膜には、32~34 ゲージの針およびハミルトンシリンジを使用して網膜下注射用に 30 ゲージの針の先端を使用した小さな下穴を開けた。手順に続いて、オフロキサシン点眼液 1 滴、続いて眼の潤滑剤を眼の表面に局所的に適用し、動物を手術から回復させた。外科的処置中の任意の時点で、注射が最適ではない、または成功しなかったと外科医が判断した場合、動物を安楽死させて交換した。

【0486】

眼の検査：細隙灯生体顕微鏡を使用して眼の検査を行い、表 18 に示す時点で眼の表面形態を評価した。I H C に指定されたすべての眼は、犠牲の 24 時間前に選択された。

【表 18】

表 18.

日	n	手順
3	1	全球/群を収集し、IHC/クライオ (OS) 用に染色するか、ceDNA (OD) の ddPCR 分析用に瞬間冷凍した**
7	1	全球/群を収集し、IHC/クライオ (OS) 用に染色するか、ceDNA (OD) の ddPCR 分析用に瞬間冷凍した**
28	2 または 4	残りの全球は、IHC/cryo (n=2/群) または ddPCR (n=4/群) のために瞬間冷凍のために収集された。

【0487】

以下に示す表 19 は、前眼部の炎症を評価するために使用されたスコアリング方法を示す。

10

20

30

40

50

【表 19】

表 19.

ラットにおける前眼部炎症の臨床的等級付け	
グレード ^a	基準
0	疾患なし、眼球は半透明で光を反射する(赤色反射)。
0.5 (痕跡)	虹彩の拡張した血管
1	虹彩の充血した血管、異常な瞳孔収縮
2	かすんでいる前房、減少した赤い逆流
3	適度に不透明な前房だが、瞳孔はまだ見える、鈍い赤い反射
4	前眼部が不透明で瞳孔が不明瞭、赤色反射がない、眼球突出
^a 上位の各グレードには、前のグレードの基準が含まれる。	

10

【0488】

エンドポイント：以下のエンドポイントを評価した。

● 体重、死亡率、臨床観察

● 完全眼科検査（OE）：ベースライン、8日目および21日目

● 肉眼的臨床観察：分泌物、斜視、結膜浮腫、前方写真によるスコープ分析

20

● 光コヒーレンストモグラフィー（OCT）：ベースライン（注射後）、7日目、および21日目

● IVIS 画像化：1日目、3日目、および14日目

● IHC（Iba1、Rho、DAPI）および ddPCR（Luc mRNA）のために採取した組織（眼球）は、以下のとおりである。

3日目－N＝1、OS免疫組織化学（IHC）、OD PCR

7日目－N＝1、OS IHC、OD PCR

28日目－N＝1、OU（両眼）IHC、残りのPCR

【0489】

インライフ画像化：上記の日に、すべての動物は、ルシフェラーゼ発現を定量化および決定するために、眼のIVIS画像化手順を受けた。基質ルシフェリンを腹腔内注射し（0.15mg/g）、注射後約5～10分でラットの画像を撮影した。各眼の周りの楕円体ROIからの総フラックス（フォトン/秒）および平均放射輝度（フォトン/秒/cm/sr）の測定値は、関連するすべての生体画像ファイルとともに、個別のデータレポートで提供された。すべての動物について、各眼は別々に画像化された。動物は彼らの側で画像化された。

30

【0490】

光コヒーレンストモグラフィー（OCT）：上記の日に、すべての動物は、網膜下注射の成功および経時変化を決定するために、眼の後部のOCT画像化手順を受けた。検査の15分前にOCTのために、トロピカミドHCL 1%および塩酸フェニレフリン 2.5%のカクテルを使用して眼を拡張した。網膜の総厚およびONLの厚さは、注射部位（ブレブ）を通過するものと通過しないものの2つのOCTスキャンから3つの位置（左、右、中央）で測定された。すべての厚さの数値は、関連するすべての注射付きOCT画像とともに、別のデータレポート（スプレッドシート）で提供された。

40

【0491】

組織の収集：3日目および7日目に群当たり1匹の動物を安楽死させた。残りの動物は注射後28日目に安楽死させた。安楽死後、眼は除核された。眼を液体窒素で瞬間冷凍し、解剖するまで－80℃で保存した。神経感覚網膜は、RPE/脈絡膜/強膜から分離された。各眼からの神経感覚網膜およびRPE/脈絡膜/強膜試料を個々の事前に秤量したチューブに収集し、組織重量を取得した。

50

【0492】

組織病理学：凍結切片に指定された眼は、別々にラベル付けされたバイアル内の4%パラホルムアルデヒドで室温で4時間固定された。次に、眼を1×リン酸緩衝生理食塩水（PBS）に移し、すぐに3%アガロース／5%スクロースに包埋し、4℃で30%スクロースに一晩沈めるか、翌日包埋するまで1×PBSに保存した。ブロックを切片化し、免疫組織化学またはヘマトキシリンおよびエオシン染色のために処理した。免疫組織化学用に指定されたスライドは、核局在化のためのDAPIとともに、ロドプシンおよびIba-1に対する抗体で染色された。残りのスライドはヘマトキシリンおよびエオシンで染色された。

【0493】

結果：ルシフェラーゼの発現は、IVIS Lumina S5インビボ画像化システム（Perkin Elmer）を使用して、1、3、および14日目に総フラックス（光子／秒）によって決定された。図24は、ss-OP4：Luc mRNA群におけるルシフェラーゼ発現が1日目および3日目にビヒクル対照と比較して増加したことを示し、対照と比較したLuc mRNA群におけるルシフェラーゼ発現を示している。14日目までに、ss-OP4：Luc mRNA群のルシフェラーゼ発現は対照と同様のレベルに減少した。図24に示すように、ss-OP4：ceDNA-Luc（CAG-fLuc発現カセットをコードするceDNA）群のルシフェラーゼ発現は、1、3、および14日目にビヒクル対照と比較して増加し、ceDNA CAG-fLuc製剤群において長期にわたる有意な蛍光を示した。図25に代表的なIVIS画像を示す。特に、これらの結果は、別の核酸（mRNA）が、本明細書に記載の切断可能脂質、特に本明細書に記載のss-OP4製剤中のmRNAとともに送達できることを示す。

【0494】

実施例13：製剤の機能的評価のためのインビトロ食作用アッセイ

MC3、MC3-5% DSG-PEG2000（1,2-ジステアロイル-rac-グリセロ-3-メチルポリオキシエチレン）（「5DSG」と略記）およびカチオン性脂質成分としてのss-OP4を含むceDNA脂質ナノ粒子（LNP）製剤を使用して、インビトロ食作用アッセイを実施した。

【0495】

図14は、0.1% DiD（DiIC18（5）、1,1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドジカルボシアニン、4-クロロベンゼンスルホン酸塩）親油性カルボシアニン色素で処理したceDNA LNPの食作用アッセイの概略図を示し、10%ヒト血清（+血清）の存在下または非存在下で、MC3、MC3-5DSG、またはss-OP4 LNPに異なる濃度のceDNA（200ng、500ng、1μgおよび2μg）を使用し、THP-1細胞から分化したマクロファージに導入した。

【0496】

図15および図16において、ceDNAを内在化した食細胞は、赤色蛍光で現れる。図15および図16に示されるように、ceDNAを含むss-OP4 LNPは、最小数の蛍光貪食細胞と高度に関連していた。したがって、理論に束縛されるものではないが、ss-OP4 LNPは、MC3-5DSGおよびMC3 LNPと比較して、免疫細胞による食作用をよりよく回避できたと考えられる。図17は、ss-OP4、MC3-5DSG、およびMC3 LNPの食作用の定量化（赤色のオブジェクト数／コンフルエンス%による）を示すグラフである。0.1%の条件では、貪食細胞は細胞数に応じて用量依存的に赤色蛍光の強度を示したため、0.1%のDiDが使用されたことに注意する。

【0497】

実際、SS切断可能脂質（例えば、ss-OP4）で製剤化されたceDNAとGalNAcとの間で相乗効果が生じ、本発明のSS切断可能脂質およびGalNAcを含むceDNA-LNPは、SS切断可能脂質のみ（ss-OP4）で製剤化されたceDNAと比較して、約4,000倍の肝細胞標的を示すが（図18B）、GalNAcを有する他のカチオン性脂質で製剤化されたceDNAは、単に約10～100倍大きい肝細胞標

10

20

30

40

50

的を示したにすぎない（データは示さず）。 $ss-OP4$ および他のカチオン性脂質LNPの両方が、同様のレベルのエンドソーム脱出を示した（図18A）。これらのデータは、 $ceDNA$ に製剤化されたSS切断可能脂質が、発現を改善し、炎症性免疫反応の緩和にプラスの効果を発揮するだけでなく、 $ceDNA$ LNPを組織特異的リガンド（例えば、肝臓特異的リガンド、 $GaLNAC$ ）で肝臓などの特定の臓器に標的化する際に相乗効果を発揮することを示唆する。

【0498】

参考文献

特許および特許出願を含むがこれらに限定されない、本明細書および本明細書の実施例で引用されるすべての刊行物および参考文献は、あたかも個々の刊行物または参考文献が、完全に記載されるように参照により本明細書に組み込まれることが具体的かつ個別に示されるかのように、それらの全体が参照により組み込まれる。この出願が優先権を主張する任意の特許出願もまた、刊行物および参考文献について上述した方法で、参照により本明細書に組み込まれる。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

（項目1）

脂質ナノ粒子（LNP）を含み、前記LNPが、SS切断可能脂質および閉端DNA（ $ceDNA$ ）を含む、薬学的組成物。

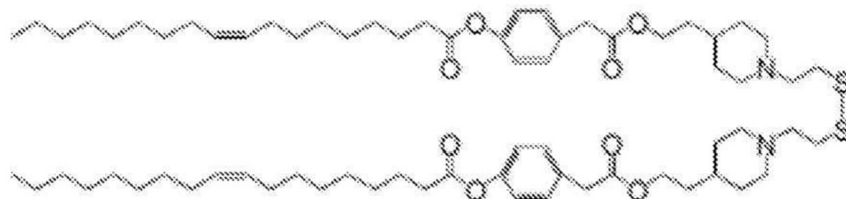
（項目2）

前記SS切断可能脂質が、ジスルフィド結合および三級アミンを含む、項目1に記載の薬学的組成物。

（項目3）

前記SS切断可能脂質が、式Iの $ss-OP$ 脂質を含む、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

【化12】



（項目4）

前記LNPが、ステロールをさらに含む、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

（項目5）

前記ステロールが、コレステロールである、項目4に記載の薬学的組成物。

（項目6）

前記LNPが、ポリエチレングリコール（PEG）をさらに含む、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

（項目7）

前記PEGが、1-（モノメトキシーポリエチレングリコール）-2,3-ジミリスチルグリセロール（PEG-DMG）である、項目6に記載の薬学的組成物。

（項目8）

前記LNPが、非カチオン性脂質をさらに含む、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

（項目9）

前記非カチオン性脂質が、ジステアロイル-sn-グリセロ-ホスホエタノールアミン、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジパルミトイルホスファチジルコリン（DPPC）、ジオレオイルホス

ファチジルグリセロール (DOPG)、ジパルミトイルホスファチジルグリセロール (DPPG)、ジオレオイルーホスファチジルエタノールアミン (DOPE)、パルミトイルオレオイルホスファチジルコリン (POPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルエタノールアミン (POPE)、ジオレオイルーホスファチジルエタノールアミン 4- (N-マレイミドメチル)-シクロヘキサン-1-カルボキシレート (DOPE-mal)、ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジミリストイルホスホエタノールアミン (DMPE)、ジステアロイルーホスファチジルーエタノールアミン (DSPPE)、モノメチルーホスファチジルエタノールアミン (16-O-モノメチルPE など)、ジメチルーホスファチジルエタノールアミン (16-O-ジメチルPE など)、18-1-トランスPE、1-ステアロイル-2-オレオイルーホスファチジエタノールアミン (SOPE)、水素化ダイズホスファチジルコリン (HSPC)、卵ホスファチジルコリン (EPC)、ジオレオイルホスファチジルセリン (DOPS)、スフィンゴミエリン (SM)、ジミリストイルホスファチジルコリン (DMPC)、ジミリストイルホスファチジルグリセロール (DMPG)、ジステアロイルホスファチジルグリセロール (DSPG)、ジェルコイルホスファチジルコリン (DEPC)、パルミトイルオレオイルホスファチジルグリセロール (POPG)、ジェライドイルーホスファチジルエタノールアミン (DEPE)、1,2-ジラウロイル-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DLPE)、1,2-ジフィタノイル (diphytanyl)-sn-グリセロ-3-ホスホエタノールアミン (DPHYPE)、レシチン、ホスファチジルエタノールアミン、リソレシチン、リゾホスファチジルエタノールアミン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルイノシトール、スフィンゴミエリン、卵スフィンゴミエリン (ESM)、セファリン、カルジオリピン、ホスファチジカシド、セレブロシド、ジセチルホスフェート、リゾホスファチジルコリン、ジリノレオイルホスファチジルコリン、またはそれらの混合物からなる群から選択される、項目 8 に記載の薬学的組成物。

(項目 10)

前記非カチオン性脂質が、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、およびジオレオイルーホスファチジルエタノールアミン (DOPE) からなる群から選択される、項目 9 に記載の薬学的組成物。

(項目 11)

前記 PEG または PEG-脂質コンジュゲートが、約 1.5%~約 3% で存在する、項目 10 に記載の薬学的組成物。

(項目 12)

前記コレステロールが、約 20%~約 40% のモルパーセンテージで存在し、前記 SS 切断可能脂質が、約 80%~約 60% のモルパーセンテージで存在する、項目 10 または 11 に記載の薬学的組成物。

(項目 13)

前記コレステロールが、約 40% のモルパーセンテージで存在し、前記 SS 切断可能脂質が、約 50% のモルパーセンテージで存在する、項目 12 に記載の薬学的組成物。

(項目 14)

前記組成物が、コレステロール、PEG または PEG-脂質コンジュゲート、および非カチオン性脂質をさらに含む、項目 1~3 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目 15)

前記 PEG または PEG-脂質コンジュゲートが、約 1.5%~約 3% で存在する、項目 14 に記載の薬学的組成物。

(項目 16)

前記コレステロールが、約 30%~約 50% のモルパーセンテージで存在する、項目 14 または 15 に記載の薬学的組成物。

(項目 17)

前記 SS 切断可能脂質が、約 42.5%~約 62.5% のモルパーセンテージで存在する、項目 14~16 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

10

20

30

40

50

(項目 18)

前記非カチオン性脂質が、約 2.5%～約 12.5%のモルパーセンテージで存在する、項目 14～17 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目 19)

前記コレステロールが、約 40%のモルパーセンテージで存在し、前記 SS 切断可能脂質が、約 52.5%のモルパーセンテージで存在し、前記非カチオン性脂質が、約 7.5%のモルパーセンテージで存在し、前記 PEG が、約 3%で存在する、項目 14～18 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目 20)

前記組成物が、パルミチン酸デキサメタゾンを含み、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

10

(項目 21)

前記 LNP が、直径が約 50 nm～約 110 nm の範囲のサイズにある、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目 22)

前記 LNP が、サイズが約 100 nm 未満である、項目 1～20 のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目 23)

前記 LNP が、サイズが約 70 nm 未満である、項目 22 に記載の薬学的組成物。

(項目 24)

前記 LNP が、サイズが約 60 nm 未満である、項目 23 に記載の薬学的組成物。

20

(項目 25)

前記組成物が、約 15:1 の全脂質対 c e DNA 比を有する、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目 26)

前記組成物が、約 30:1 の全脂質対 c e DNA 比を有する、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目 27)

前記組成物が、約 40:1 の全脂質対 c e DNA 比を有する、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

30

(項目 28)

前記組成物が、約 50:1 の全脂質対 c e DNA 比を有する、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目 29)

前記組成物が、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) をさらに含む、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目 30)

前記 GalNAc が、前記全脂質の 0.5%のモルパーセンテージで前記 LNP 中に存在する、項目 29 に記載の薬学的組成物。

(項目 31)

前記組成物が、約 10 mM～約 30 mM のリンゴ酸をさらに含む、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

40

(項目 32)

前記組成物が、約 20 mM のリンゴ酸を含む、項目 31 に記載の薬学的組成物。

(項目 33)

前記組成物が、約 30 mM～約 50 mM の NaCl をさらに含む、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目 34)

前記組成物が、約 40 mM の NaCl を含む、項目 33 に記載の薬学的組成物。

(項目 35)

50

前記組成物が、約20mM～約100mMのMgCl₂をさらに含む、項目1～33のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目36)

前記ceDNAが、閉端直鎖状二重鎖DNAである、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目37)

前記ceDNAが、プロモーター配列および導入遺伝子を含む発現カセットを含む、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目38)

前記ceDNAが、ポリアデニル化配列を含む発現カセットを含む、項目37に記載の薬学的組成物。

10

(項目39)

前記ceDNAが、前記発現カセットの5'または3'末端のいずれかに隣接する少なくとも1つの逆位末端反復(ITR)を含む、項目36～38のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目40)

前記発現カセットが、2つのITRに隣接し、前記2つのITRが、1つの5'ITRおよび1つの3'ITRを含む、項目39に記載の薬学的組成物。

(項目41)

前記発現カセットが、3'末端でITR(3'ITR)に連結される、項目39に記載の薬学的組成物。

20

(項目42)

前記発現カセットが、5'末端でITR(5'ITR)に連結される、項目39に記載の薬学的組成物。

(項目43)

5'ITRおよび3'ITRのうちの少なくとも1つが、野生型AAVITRである、項目39に記載の薬学的組成物。

(項目44)

5'ITRおよび3'ITRのうちの少なくとも1つが、修飾型ITRである、項目39に記載の薬学的組成物。

30

(項目45)

前記ceDNAが、5'ITRと前記発現カセットとの間にスペーサー配列をさらに含む、項目39に記載の薬学的組成物。

(項目46)

前記ceDNAが、3'ITRと前記発現カセットとの間にスペーサー配列をさらに含む、項目39に記載の薬学的組成物。

(項目47)

前記スペーサー配列が、長さが少なくとも5塩基対の長さである、項目45または項目46に記載の薬学的組成物。

(項目48)

前記スペーサー配列が、長さが5～100塩基対の長さである、項目47に記載の薬学的組成物。

40

(項目49)

前記スペーサー配列が、長さが5～500塩基対の長さである、項目47に記載の薬学的組成物。

(項目50)

前記ceDNAが、ニックまたはギャップを有する、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目51)

前記ITRが、AAV血清型に由来するITRであり、ガチョウウイルスのITRに由

50

来し、B 1 9 ウイルス I T R に由来し、パルボウイルスからの野生型 I T R である、項目 3 9 に記載の薬学的組成物。

(項目 5 2)

前記 A A V 血清型が、A A V 1、A A V 2、A A V 3、A A V 4、A A V 5、A A V 6、A A V 7、A A V 8、A A V 9、A A V 1 0、A A V 1 1 および A A V 1 2 を含む群から選択される、項目 5 1 に記載の薬学的組成物。

(項目 5 3)

前記 I T R が、変異体 I T R であり、前記 c e D N A が、第 1 の I T R とは異なる追加の I T R を任意選択的に含む、項目 3 9 に記載の薬学的組成物。

(項目 5 4)

前記 c e D N A が、前記発現カセットの 5 ' および 3 ' 末端の両方に 2 つの変異体 I T R を含み、任意選択的に、前記 2 つの変異体 I T R が、対称変異体である、項目 3 9 に記載の薬学的組成物。

(項目 5 5)

前記 c e D N A が、C E L i D、DNA ベースのミニサークル、M I D G E、ミニスターリング (m i n i s t e r i n g) DNA、発現カセットの 5 ' および 3 ' 末端に I T R の 2 つのヘアピン構造を含むダンベル型の直鎖状二重鎖閉端 DNA、または d o g g y b o n e (商標) DNA である、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目 5 6)

薬学的に許容される賦形剤をさらに含む、先行項目のいずれか一項に記載の薬学的組成物。

(項目 5 7)

対象における遺伝性障害を治療する方法であって、前記方法が、先行項目のいずれか一項に記載の有効量の薬学的組成物を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 5 8)

前記対象が、ヒトである、項目 5 0 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記遺伝性障害が、鎌状赤血球貧血症、メラノーマ、血友病 A (凝固因子 V I I I (F V I I I) 欠損症) および血友病 B (凝固因子 I X (F I X) 欠損症)、嚢胞性線維症 (C F T R)、家族性高コレステロール血症 (L D L 受容体欠損症)、肝芽細胞腫、ウィルソン病、フェニルケトン尿症 (P K U)、先天性肝性ポルフィリン症、遺伝性肝代謝障害、レッシュナイハン症候群、鎌状赤血球貧血症、サラセミア、色素性乾皮症、ファンconi 貧血、網膜色素変性症、毛細血管拡張性運動失調症、ブルーム症候群、網膜芽細胞腫、ムコ多糖蓄積症 (例えば、ハーラー症候群 (M P S I 型)、シャイエ症候群 (M P S I S 型)、ハーラーシャイエ症候群 (M P S I H - S 型)、ハンター症候群 (M P S I I 型)、サンフィリップ A、B、C、および D 型 (M P S I I I A、B、C、および D 型)、モルキオ A および B 型 (M P S I V A および M P S I V B)、マロトーラミー症候群 (M P S V I 型)、スライ症候群 (M P S V I I 型)、ヒアルロニダーゼ欠損症 (M P S I X 型)、ニーマンピック病 A / B、C 1 および C 2 型、ファブリー病、シンドラー病、G M 2 - ガングリオシドーシス I I 型 (サンドホフ病)、テイサックス病、異染性白質ジストロフィー、クラッペ病、ムコリビドーシス I、I I / I I I および I V 型、シアリドーシス I および I I 型、グリコーゲン蓄積症 I および I I 型 (ポンペ病)、ゴーシェ病 I、I I および I I I 型、ファブリー病、シスチン症、バッテン病、アスパルチルグルコサミン尿症、サラ病、ダノン病 (L A M P - 2 欠損症)、リソソーム酸性リパーゼ (L A L) 欠損症、神経セロイドリポフスチン症 (C L N 1 - 8、I N C L、および L I N C L)、スフィンゴリビドーシス、ガラクトシアリドーシス、筋萎縮性側索硬化症 (A L S)、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、フリードライヒ運動失調症、デュシェンヌ筋ジストロフィー (D M D)、ベッカー筋ジストロフィー (B M D)、ジストロフィー表皮水疱症 (D E B)、エクトヌクレオチドピロホスファターゼ 1 欠損症、乳児期の全身性動脈石灰化 (G A C I)、レーバー先

10

20

30

40

50

天性黒内障、シュタルガルト黄斑ジストロフィー（A B C A 4）、オルニチントランスカルバミラーゼ（O T C）欠損症、アッシャー症候群、アルファー 1 アンチトリプシン欠損症、ならびにカテプシン A 欠損症からなる群から選択される、項目 5 7 または 5 8 に記載の方法。

（項目 6 0）

前記遺伝性障害が、レーバー先天性黒内障（L C A）である、項目 5 9 に記載の方法。

（項目 6 1）

前記 L C A が、L C A 1 0 である、項目 6 0 に記載の方法。

（項目 6 2）

前記遺伝性障害が、ニーマンピック病である、項目 5 9 に記載の方法。

10

（項目 6 3）

前記遺伝性障害が、シュタルガルト黄斑ジストロフィーである、項目 5 9 に記載の方法。

（項目 6 4）

前記遺伝性障害が、グルコース-6-ホスファターゼ（G 6 P a s e）欠損症（グリコーゲン蓄積症 I 型）またはポンペ病（グリコーゲン蓄積症 II 型）である、項目 5 9 に記載の方法。

（項目 6 5）

前記遺伝性障害が、血友病 A（因子 V I I I 欠損症）である、項目 5 9 に記載の方法。

（項目 6 6）

前記遺伝性障害が、血友病 B（因子 I X 欠損症）である、項目 5 9 に記載の方法。

20

（項目 6 7）

前記遺伝性障害が、ハンター症候群（ムコ多糖症 II 型）である、項目 5 9 に記載の方法。

（項目 6 8）

前記遺伝性障害が、嚢胞性線維症である、項目 5 9 に記載の方法。

（項目 6 9）

前記遺伝性障害が、ジストロフィー表皮水疱症（D E B）である、項目 5 9 に記載の方法。

（項目 7 0）

前記遺伝性障害が、フェニルケトン尿症（P K U）である、項目 5 9 に記載の方法。

30

（項目 7 1）

前記遺伝性障害が、ヒアルロニダーゼ欠損症である、項目 5 9 に記載の方法。

（項目 7 2）

免疫抑制剤を投与することをさらに含む、項目 5 7 ～ 7 1 のいずれか一項に記載の方法。

（項目 7 3）

前記免疫抑制剤が、デキサメタゾンである、項目 7 2 に記載の方法。

（項目 7 4）

前記対象が、主要なカチオン性脂質として M C 3 を含む L N P で観察された免疫応答レベルと比較して、前記薬学的組成物に対して低下した免疫応答レベルを示し、前記薬学的組成物に対する前記免疫応答レベルが、M C 3 を含む前記 L N P で観察された前記レベルよりも少なくとも 5 0 % 低い、項目 5 7 ～ 7 3 のいずれか一項に記載の方法。

40

（項目 7 5）

前記免疫応答が、炎症誘発性サイトカインまたはケモカインの前記レベルを検出することによって測定される、項目 7 4 に記載の方法。

（項目 7 6）

前記炎症誘発性サイトカインまたはケモカインが、I L - 6、I F N α 、I F N γ 、I L - 1 8、T N F α 、I P - 1 0、M C P - 1、M I P 1 α 、M I P 1 β 、および R A N T E S からなる群から選択される、項目 7 5 に記載の方法。

（項目 7 7）

前記炎症誘発性サイトカインのうちの少なくとも 1 つが、前記薬学的組成物の投与の 6

50

時間後に前記対象の血清中で検出可能なレベル未満である、項目 76 に記載の方法。

(項目 78)

前記 SS 切断可能脂質および前記閉端 DNA (ceDNA) を含む前記 LNP が、貪食されないか、または同様の条件で投与された主要なカチオン性脂質として MC3 を含む LNP の食作用レベルと比較して、少なくとも 50% 低下した食作用レベルを示す、項目 57 ~ 77 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 79)

前記 SS 切断可能脂質が、式 I の ss-OP である、項目 78 に記載の方法。

(項目 80)

前記 LNP が、コレステロールおよび PEG-脂質コンジュゲートをさらに含む、項目 79 に記載の方法。

10

(項目 81)

前記 LNP が、非カチオン性脂質をさらに含む、項目 80 に記載の方法。

(項目 82)

前記非カチオン性脂質が、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、およびジオレオイル-ホスファチジエタノールアミン (DOPE) からなる群から選択される、項目 81 に記載の方法。

(項目 83)

前記 LNP が、N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) をさらに含む、項目 80 または 81 に記載の方法。

20

(項目 84)

前記 GalNAc が、全脂質の 0.5% のモルパーセンテージで前記 LNP 中に存在する、項目 83 に記載の方法。

(項目 85)

治療を必要とする対象の肝臓を標的とする治療用核酸を増加させる方法であって、前記方法が、治療用核酸、ss 切断可能脂質、ステロール、ならびにポリエチレングリコール (PEG) および N-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を含む有効量の脂質ナノ粒子 LNP を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目 86)

前記 PEG が、1-(モノメトキシーポリエチレングリコール)-2,3-ジミリスチルグリセロール (PEG-DMG) である、項目 85 に記載の方法。

30

(項目 87)

前記 LNP が、非カチオン性脂質をさらに含む、項目 85 に記載の方法。

(項目 88)

前記非カチオン性脂質が、ジオレオイルホスファチジルコリン (DOPC)、ジステアロイルホスファチジルコリン (DSPC)、およびジオレオイル-ホスファチジエタノールアミン (DOPE) からなる群から選択される、項目 87 に記載の方法。

(項目 89)

前記 GalNAc が、全脂質の 0.5% のモルパーセンテージで前記 LNP 中に存在する、項目 85 に記載の薬学的組成物。

40

(項目 90)

前記対象が、遺伝性障害に罹患している、項目 85 に記載の方法。

(項目 91)

前記遺伝性障害が、血友病 A (因子 VIII 欠損症) である、項目 90 に記載の方法。

(項目 92)

前記遺伝性障害が、血友病 B (因子 IX 欠損症) である、項目 90 に記載の方法。

(項目 93)

前記遺伝性障害が、フェニルケトン尿症 (PKU) である、項目 90 に記載の方法。

(項目 94)

前記治療用核酸が、ミニ遺伝子、プラスミド、ミニサークル、低分子干渉 RNA (si

50

RNA)、マイクロRNA (miRNA)、アンチセンスオリゴヌクレオチド (ASO)、リボザイム、ceDNA、ミニストリング、doggybone (商標)、プロテロメア閉端DNA、またはダンベル直鎖状DNA、ダイサー基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA (shRNA)、非対称干渉RNA (aiRNA)、マイクロRNA (miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、DNAウイルスベクター、ウイルスRNAベクター、非ウイルスベクター、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、項目85に記載の方法。

(項目95)

前記治療用核酸が、ceDNAである、項目85に記載の方法。

(項目96)

前記ceDNAが、プロモーター配列および導入遺伝子を含む発現カセットを含む、項目95に記載の方法。

(項目97)

前記ceDNAが、前記発現カセットの5'または3'末端のいずれかに隣接する少なくとも1つの逆位末端反復 (ITR) を含む、項目96に記載の方法。

(項目98)

前記ceDNAが、CELiD、MIDGE、ミニスタリングDNA、発現カセットの前記5'および3'末端にITRの2つのヘアピン構造を含むダンベル型の直鎖状二重鎖閉端DNA、またはdoggybone (商標) DNAからなる群から選択され、前記ceDNAが、カプシド不含および直鎖状二重鎖DNAである、項目95に記載の方法。

(項目99)

治療用核酸 (TNA) による治療を必要とする対象における補体応答を軽減する方法であって、前記方法が、前記TNA、ss切断可能脂質、ステロール、ポリエチレングリコール (PEG) およびN-アセチルガラクトサミン (GalNAc) を含む有効量の脂質ナノ粒子 (LNP) を前記対象に投与することを含む、方法。

(項目100)

前記対象が、遺伝性障害に罹患している、項目99に記載の方法。

(項目101)

前記遺伝性障害が、鎌状赤血球貧血症、メラノーマ、血友病A (凝固因子VIIII (FVIIII) 欠損症) および血友病B (凝固因子IX (FIX) 欠損症)、嚢胞性線維症 (CFTR)、家族性高コレステロール血症 (LDL受容体欠損症)、肝芽細胞腫、ウィルソン病、フェニルケトン尿症 (PKU)、先天性肝性ポルフィリン症、遺伝性肝代謝障害、レッシュナイハン症候群、鎌状赤血球貧血症、サラセミア、色素性乾皮症、ファンconi貧血、網膜色素変性症、毛細血管拡張性運動失調症、ブルーム症候群、網膜芽細胞腫、ムコ多糖蓄積症 (例えば、ハーラー症候群 (MPS I型)、シャイエ症候群 (MPS IS型)、ハーラーシャイエ症候群 (MPS IHS型)、ハンター症候群 (MPS I型)、サンフィリップA、B、C、およびD型 (MPS IIA、B、C、およびD型)、モルキオAおよびB型 (MPS IVAおよびMPS IVB)、マロトーラミー症候群 (MPS VI型)、スライ症候群 (MPS VII型)、ヒアルロニダーゼ欠損症 (MPS IX型)、ニーマンピック病A/B、C1およびC2型、ファブリー病、シンドラー病、GM2-ガングリオシドーシスII型 (サンドホフ病)、テイサックス病、異染色性白質ジストロフィー、クラッベ病、ムコリピドーシスI、II/IIIおよびIV型、シアリドーシスIおよびII型、グリコーゲン蓄積症IおよびII型 (ポンペ病)、ゴーシェ病I、IIおよびIII型、ファブリー病、シスチン症、バッテン病、アスパルチルグルコサミン尿症、サラ病、ダノン病 (LAMP-2欠損症)、リソソーム酸性リパーゼ (LAL) 欠損症、神経セロイドリポフスチン症 (CLN1-8、INCL、およびLINCL)、スフィンゴリピドーシス、ガラクトシアリドーシス、筋萎縮性側索硬化症 (ALS)、パーキンソン病、アルツハイマー病、ハンチントン病、脊髄小脳失調症、脊髄性筋萎縮症、フリードライヒ運動失調症、デュシェンヌ筋ジストロフィー (DMD)、ベッカー筋ジストロフィー (BMD)、ジストロフィー表皮水疱症 (DEB)、エクトヌクレオ

10

20

30

40

50

チドピロホスファターゼ1欠損症、乳児期の全身性動脈石灰化（GACI）、レーバー先天性黒内障、シュタルガルト黄斑ジストロフィー（ABCA4）、オルニチントランスカルバミラーゼ（OTC）欠損症、アッシャー症候群、アルファー1アンチトリプシン欠損症、ならびにカテプシンA欠損症からなる群から選択される、項目100に記載の方法。

（項目102）

前記治療用核酸が、ミニ遺伝子、プラスミド、ミニサークル、低分子干渉RNA（siRNA）、マイクロRNA（miRNA）、アンチセンスオリゴヌクレオチド（ASO）、リボザイム、ceDNA、ミニストリング、doggybone（商標）、プロテロメア閉端DNA、またはダンベル直鎖状DNA、ダイサー基質dsRNA、低分子ヘアピンRNA（shRNA）、非対称干渉RNA（aiRNA）、マイクロRNA（miRNA）、mRNA、tRNA、rRNA、DNAウイルスベクター、ウイルスRNAベクター、非ウイルスベクター、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される、項目99に記載の方法。

10

（項目103）

前記ceDNAが、CELiD、MIDGE、ミニスタリングDNA、発現カセットの前記5'および3'末端にITRの2つのヘアピン構造を含むダンベル型の直鎖状二重鎖閉端DNA、またはdoggybone（商標）DNAからなる群から選択され、前記ceDNAが、カプシド不含および直鎖状二重鎖DNAである、項目102に記載の方法。

（項目104）

前記PEGが、1-（モノメトキシーポリエチレングリコール）-2,3-ジミリストイルグリセロール（PEG-DMG）である、項目99に記載の方法。

20

（項目105）

前記PEGが、約2～4%の分子パーセンテージで前記LNP中に存在する、項目104に記載の方法。

（項目106）

前記PEGが、約3%の分子パーセンテージで前記LNP中に存在する、項目105に記載の方法。

（項目107）

前記LNPが、非カチオン性脂質をさらに含む、項目99に記載の方法。

（項目108）

前記非カチオン性脂質が、ジオレオイルホスファチジルコリン（DOPC）、ジステアロイルホスファチジルコリン（DSPC）、およびジオレオイルホスファチジルエタノールアミン（DOPE）からなる群から選択される、項目107に記載の方法。

30

（項目109）

前記GalNAcが、全脂質の約0.3～1%のモルパーセンテージで前記LNP中に存在する、項目99に記載の方法。

（項目110）

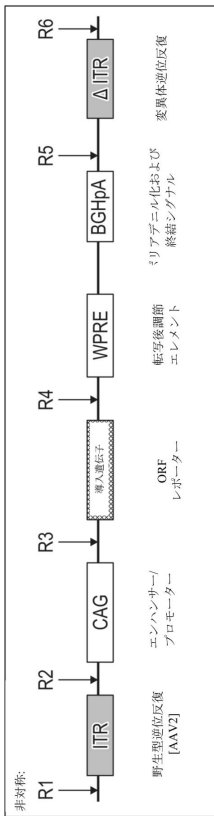
前記GalNAcが、全脂質の約0.5%のモルパーセンテージで前記LNP中に存在する、項目107に記載の方法。

40

【図面】

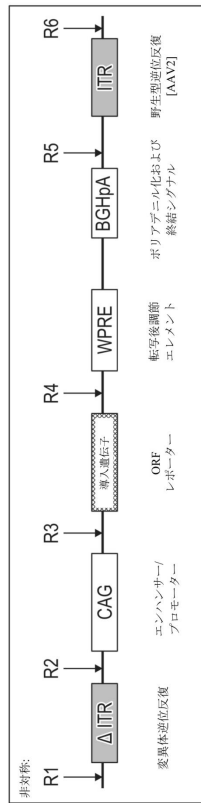
【図 1 A】

【図 1 A】



【図 1 B】

【図 1 B】

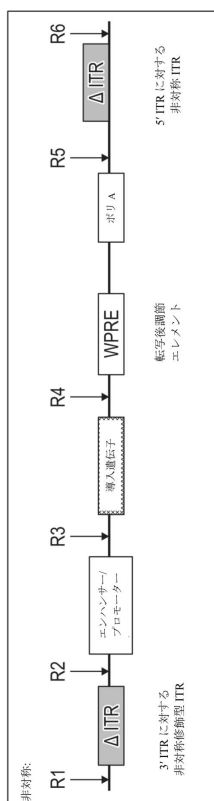


10

20

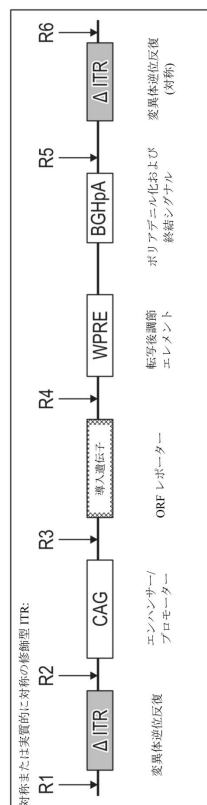
【図 1 C】

【図 1 C】



【図 1 D】

【図 1 D】



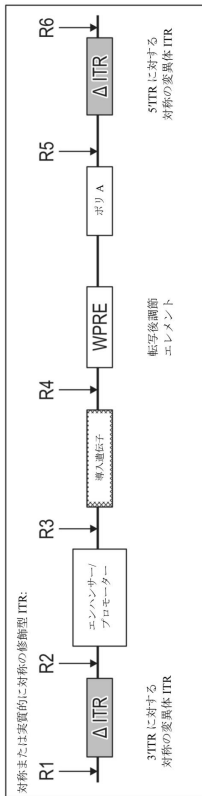
30

40

50

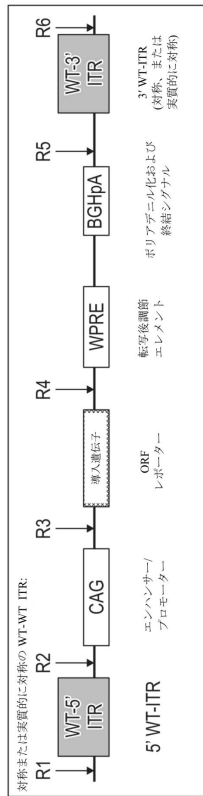
【図 1 E】

【図 1 E】



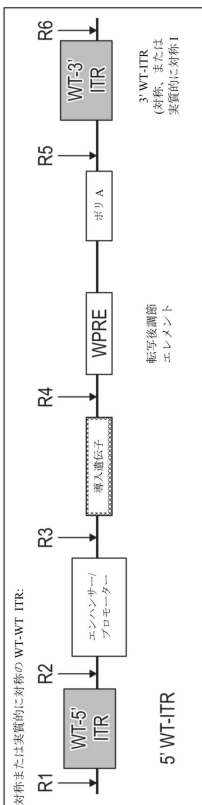
【図 1 F】

【図 1 F】



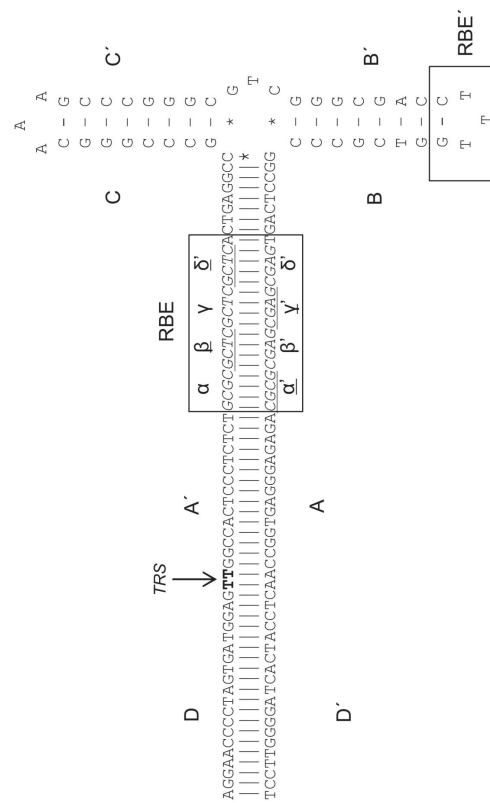
【図 1 G】

【図 1 G】



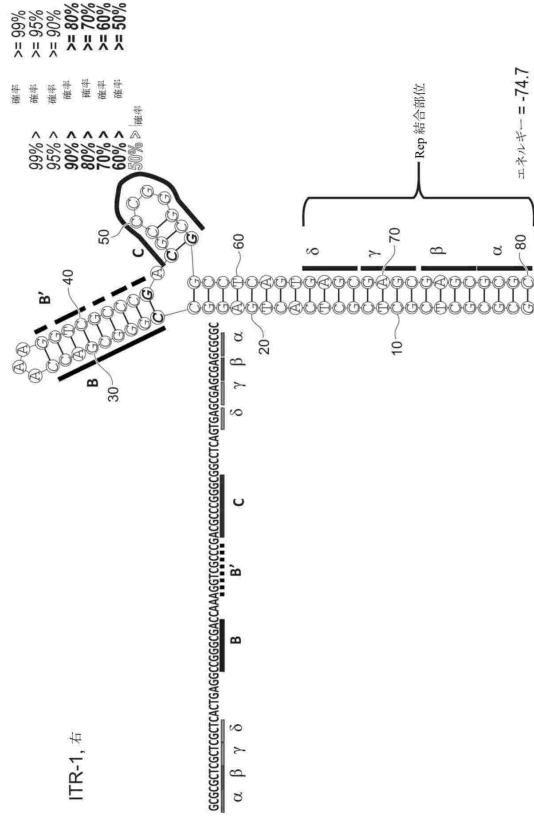
【図 2 A】

【図 2 A】



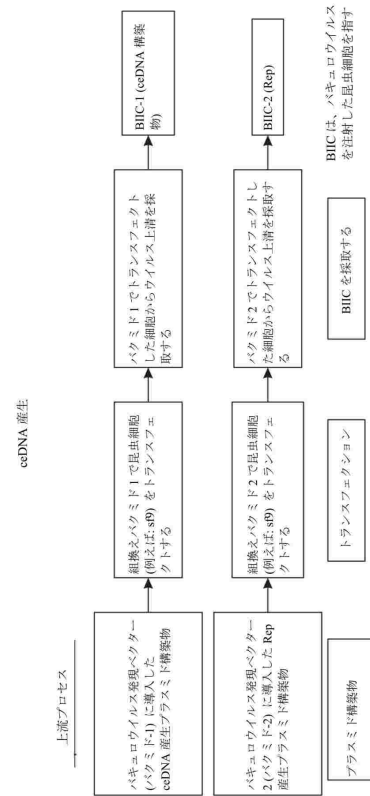
【図 3 D】

【图 3 D】



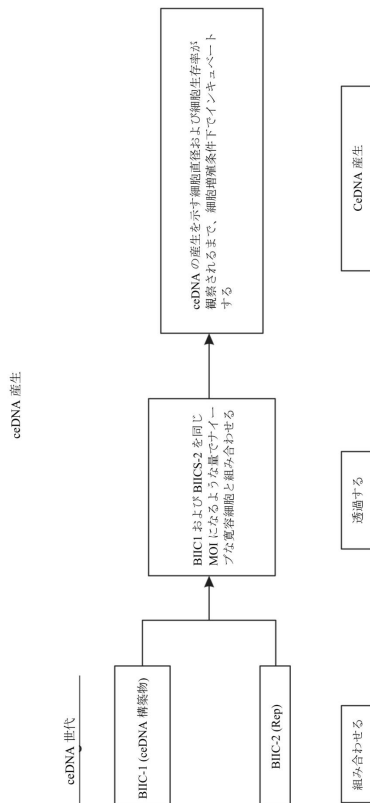
【図 4 A】

【図 4 A】



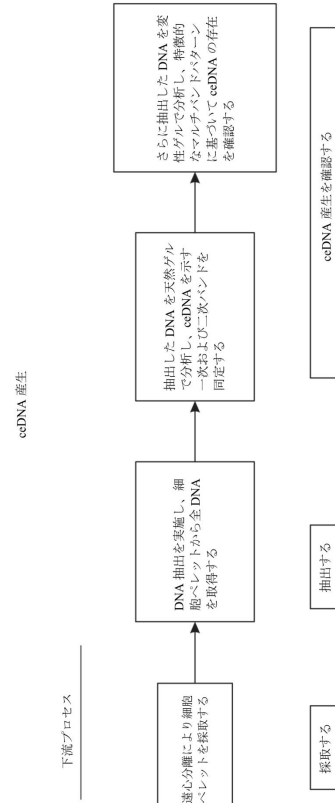
【図 4 B】

【図 4 B】



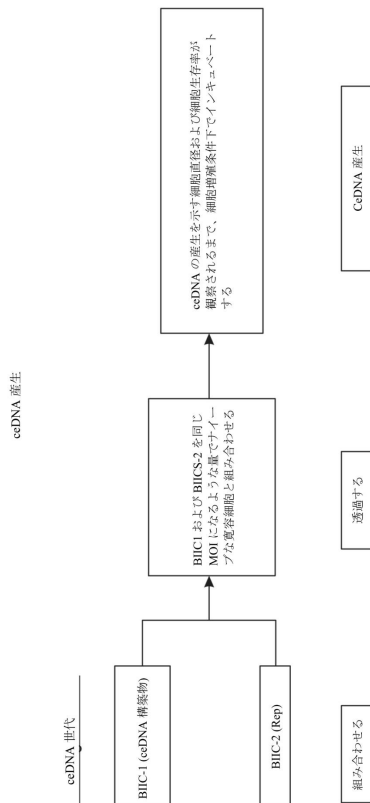
【図 4 C】

【図4C】



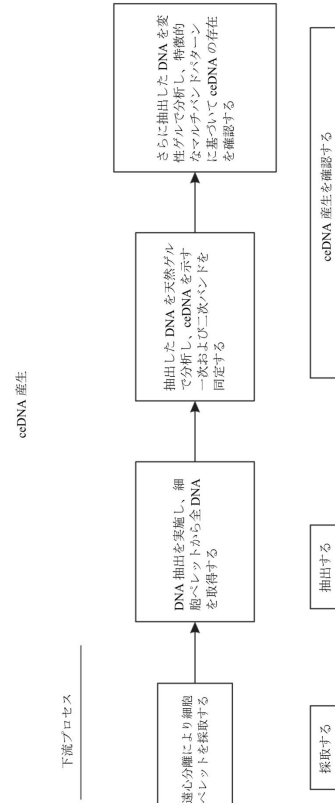
【図 4 B】

【図 4 B】



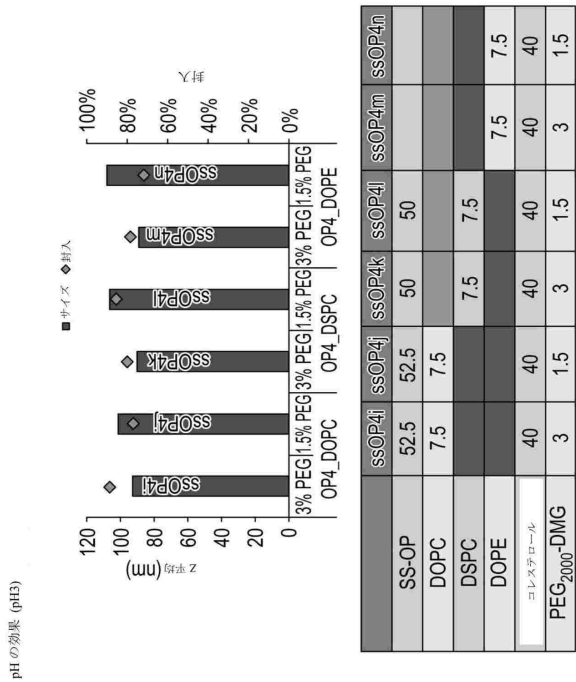
【図 4 C】

【図4C】



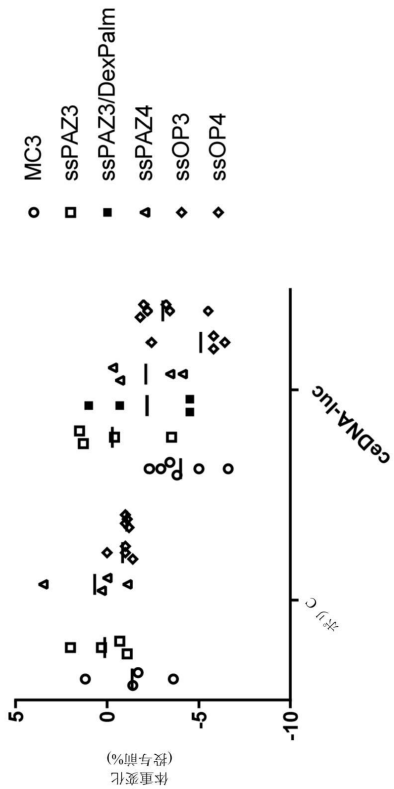
【図 6 B】

【図 6 B】



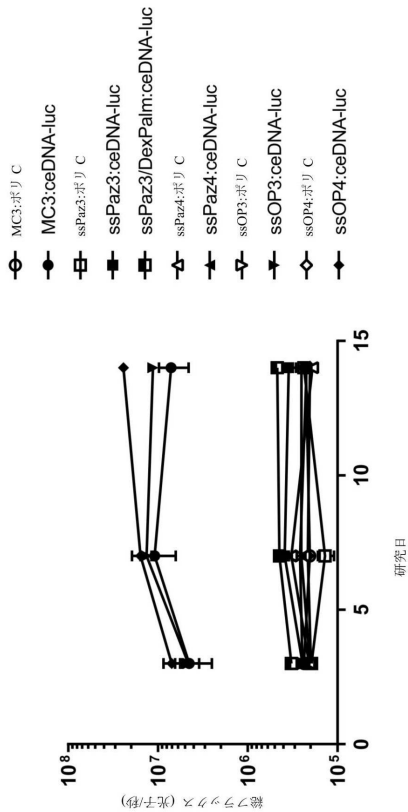
【図 7】

【図 7】



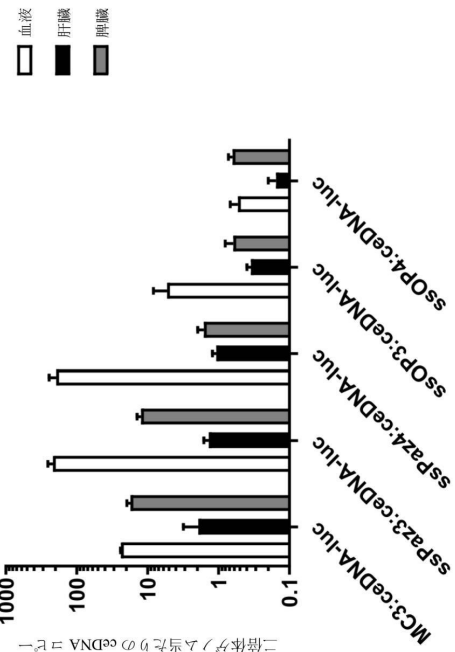
【図 8】

【図 8】



【図 9】

【図 9】



10

20

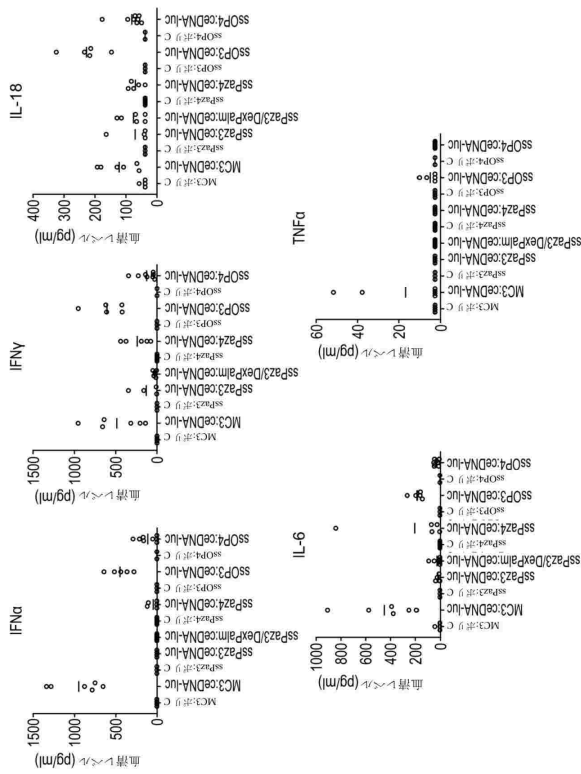
30

40

50

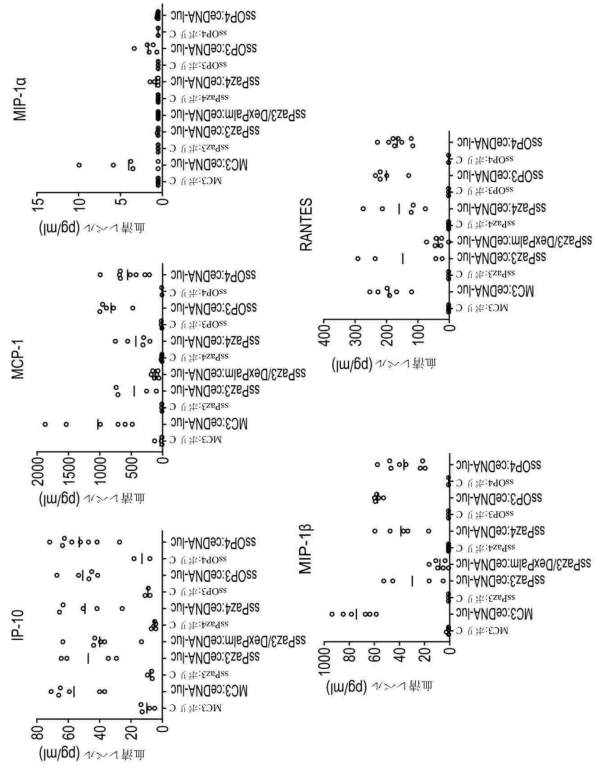
【図 10 A】

【図 10 A】



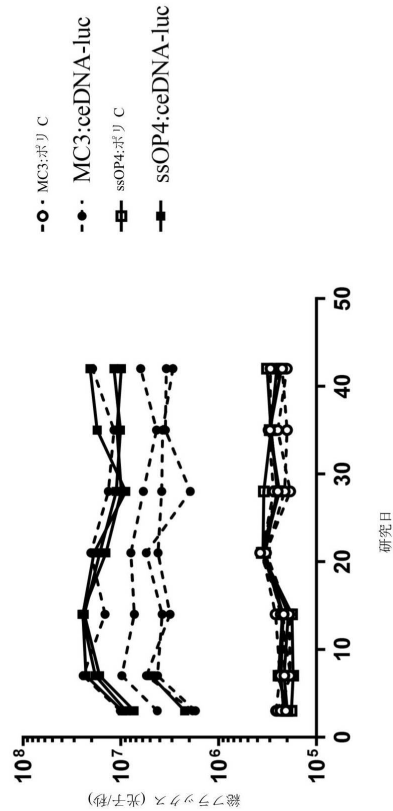
【図 10 B】

【図 10 B】



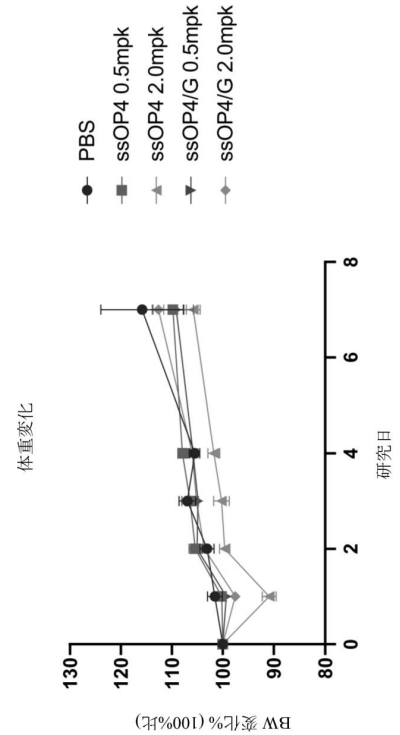
【図 11】

【図 11】



【図 12 A】

【図 12 A】



10

20

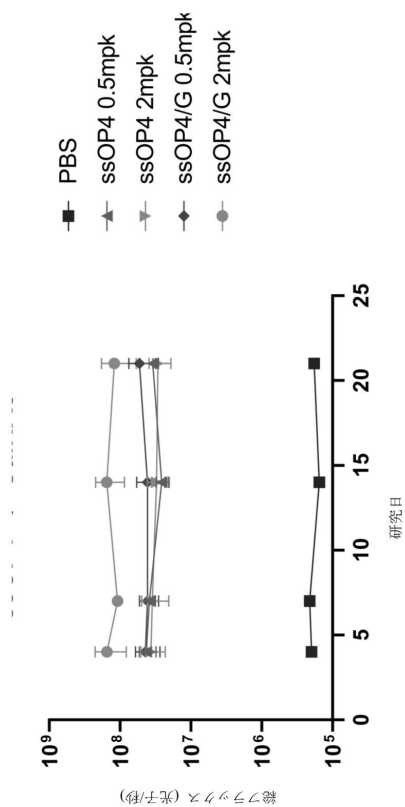
30

40

50

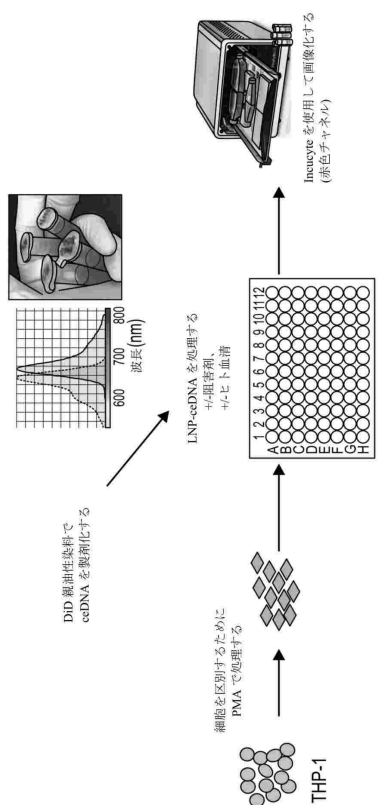
【図 1 2 B】

【図 1 2 B】



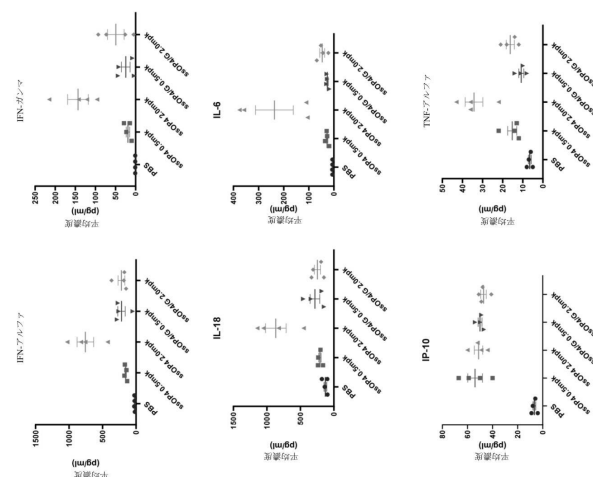
【図 14】

【图 1-4】



【図 13】

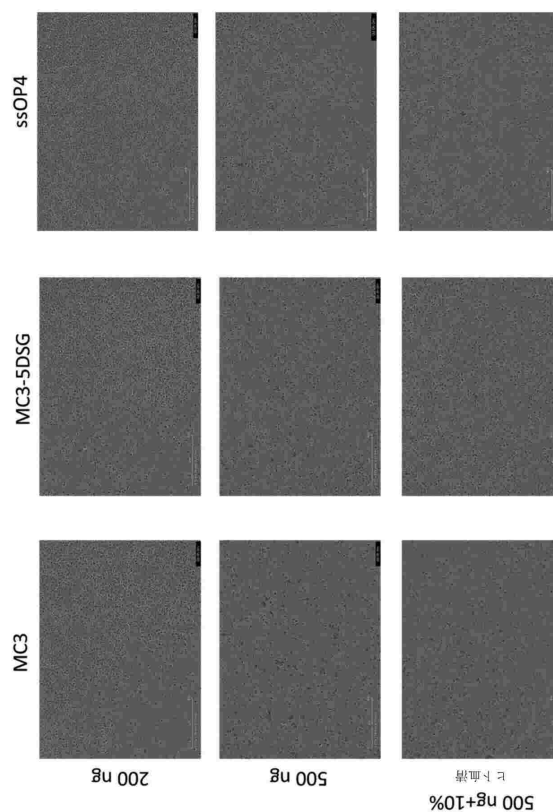
【图 1 3】



G=GalNAc (0.5%のモル比)

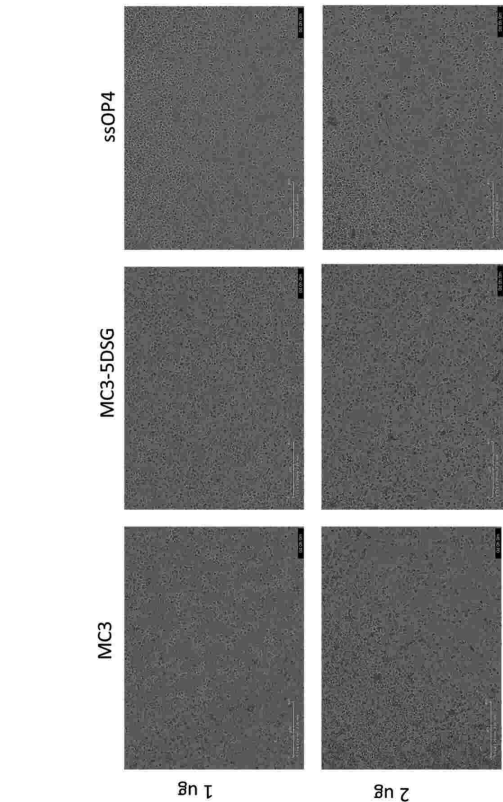
【図 15】

【图 1 5】



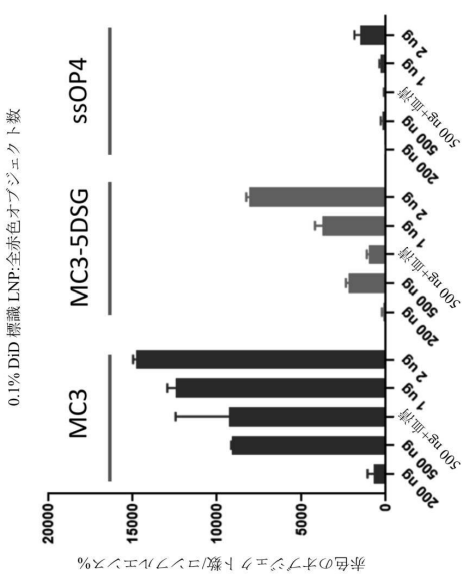
【図 1 6】

【図 1 6】



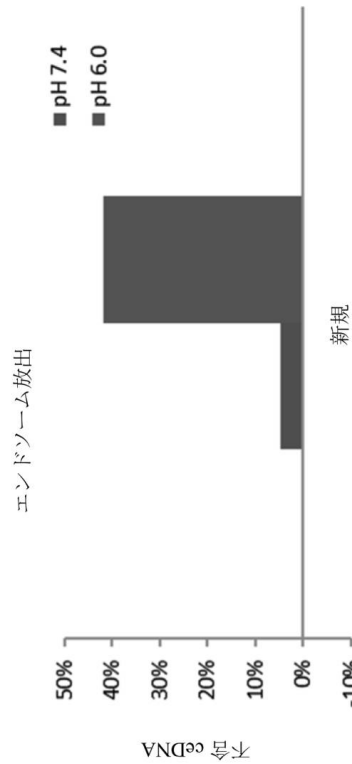
【図 1 7】

【図 1 7】



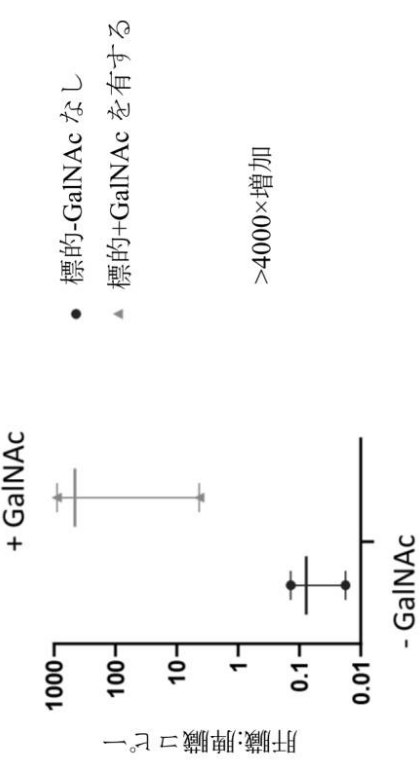
【図 1 8 A】

【図 1 8 A】



【図 1 8 B】

【図 1 8 B】



10

20

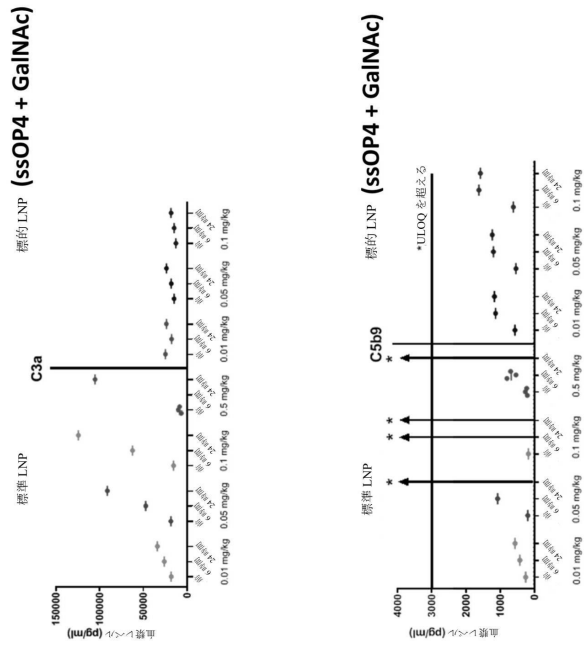
30

40

50

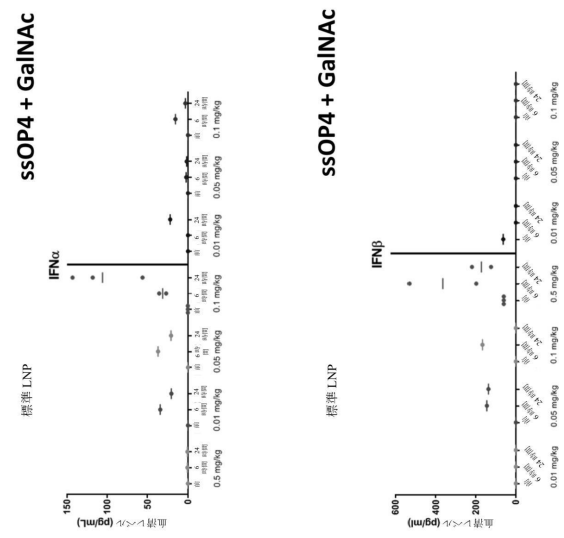
【図 19】

【図 19】



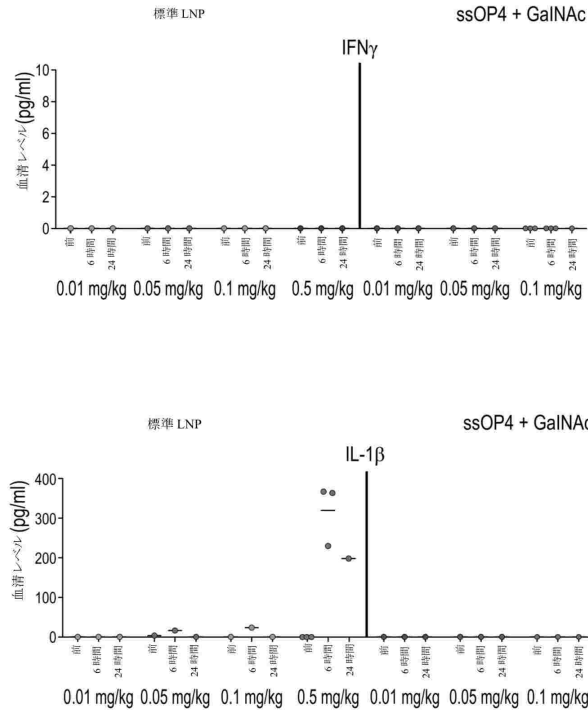
【図 20】

【図 20】



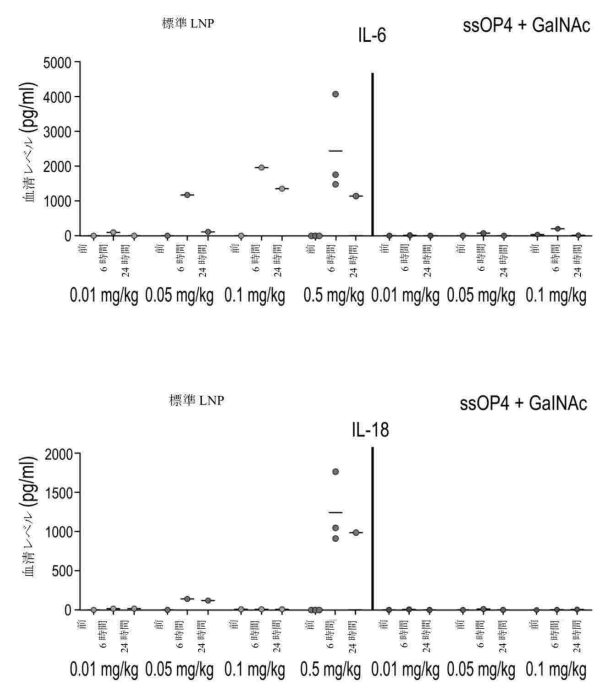
【図 21】

【図 21】



【図 22】

【図 22】



10

20

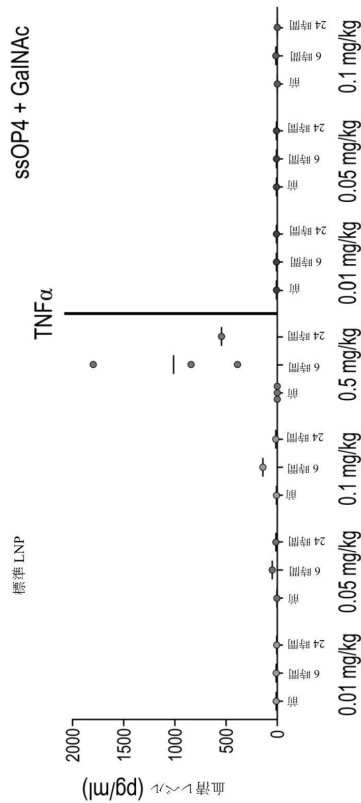
30

40

50

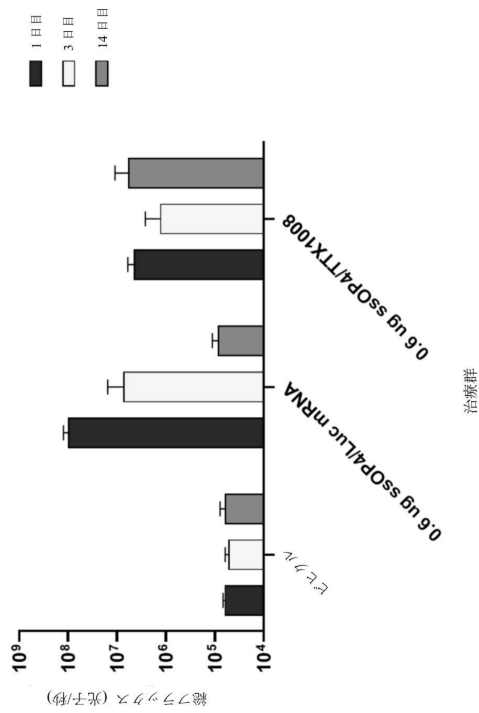
【図 2 3】

【図 2 3】



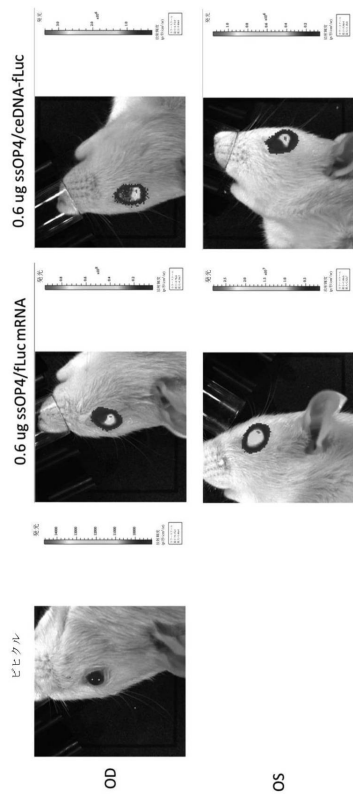
【図 2 4】

【図 2 4】



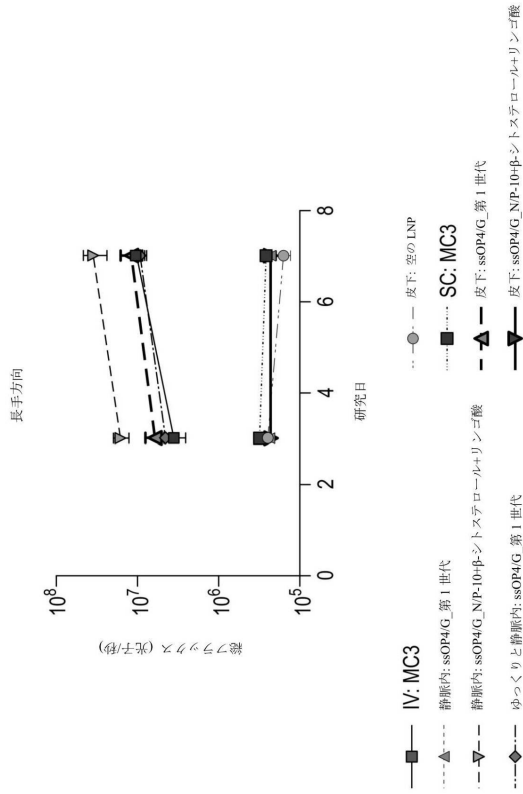
【図 2 5】

【図 2 5】



【図 2 6】

【図 2 6】



10

20

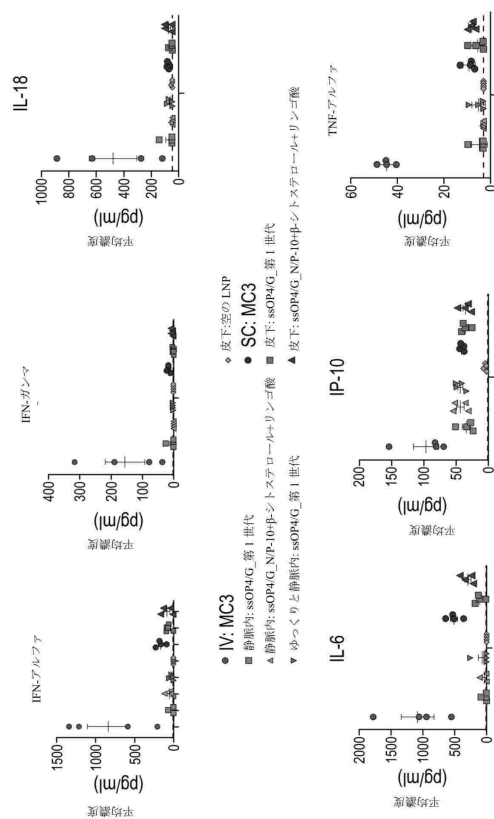
30

40

50

【圖 27】

【图 27】



【配列表】

0007700101000001.app

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	47/24 (2006.01)	A 6 1 K	47/24
A 6 1 K	47/12 (2006.01)	A 6 1 K	47/12
A 6 1 K	31/711 (2006.01)	A 6 1 K	31/711
A 6 1 K	31/7105 (2006.01)	A 6 1 K	31/7105
A 6 1 K	31/573 (2006.01)	A 6 1 K	31/573
A 6 1 K	48/00 (2006.01)	A 6 1 K	48/00

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/896,980

(32)優先日 令和1年9月6日(2019.9.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 スー, ジェ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301,
4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 リー, ブルーデンス ユイ トウン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301,
4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 クラット, デブラ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301,
4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 リウ, リア ユー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301,
4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 チオッコ, マシュー ジェイムズ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301,
4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 スタントン, マシュー ジー.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301,
4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 モフィット, ジェフ

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301,
4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

(72)発明者 チャタートン, ジョン エドワード

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 02142, ケンブリッジ, ビニー ストリート 301,
4ティーエイチ フロア, ジェネレーション バイオ カンパニー 気付

審査官 金子 亜希

(56)参考文献 国際公開第2013/073480 (WO, A1)

国際公開第2019/051289 (WO, A1)

特表2015-518472 (JP, A)

特表2014-523870 (JP, A)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 9/00-9/72

A 6 1 K 47/00-47/69

A 6 1 K 31/00-31/80

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)